

Messtechnische Möglichkeiten zur Ermittlung Partieller Taubährigkeit bei
Winterweizen mittels Chlorophyllfluoreszenz- und hyperspektraler
Bildanalyse

D i s s e r t a t i o n

**zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum agriculturarum
(Dr. rer. agr.)**

**eingereicht an der
Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin**

von

Dipl.-Biol. Elke Bauriegel geb. Janasek

Präsident

der Humboldt-Universität zu Berlin:

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der

Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät:

Prof. Dr. Dr. h. c. Frank Ellmer

Gutachter: 1. Prof. Dr. Uwe Schmidt

2. Prof. Dr. Thomas Rath

3. Dr. Martin Geyer

4. Dr. Werner B. Herppich

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Januar 2012

Abstract (deutsch)

Fusarium-Infektionen sind ein ernstes Problem im Weizenanbau, da die ausgeschiedenen Mykotoxine gesundheitsschädlich sind. Die Krankheitssymptome der durch *Fusarium spp.* hervorgerufenen Partiellen Taubährigkeit sind durch bildanalytische Methoden im Vorfeld der Ernte detektierbar. Die Produzenten könnten mit den Informationen der Bildanalyse den *Fusarium*-Befall frühzeitig erkennen, die befallenen Partien getrennt beernten und gegebenenfalls anderen Verwertungsformen zuführen.

Künstlich mit *Fusarium culmorum* infizierte Weizenpflanzen wurden mittels Chlorophyllfluoreszenz- und hyperspektraler Bildanalyse in Zeitreihenversuchen analysiert. Bei den Chlorophyllfluoreszenz-Bildanalysen wurde die photosynthetische Effizienz (F_v/F_m) und deren räumliche Ungleichverteilung genutzt, um den Effekt des Krankheitsgrades auf die photosynthetische Aktivität zu ermitteln. Mit dieser Methode ist eine sehr frühzeitige Erkennung möglich, da eine Verringerung der photosynthetischen Effizienz bei den kranken Ähren zwischen dem 6. und 11. Tag nach Inokulation festgestellt wurde. Der Befallsgrad korreliert mit der photosynthetischen Effizienz. Die Berechnung des kumulativen F_v/F_m bei 0,3 führte zu einer sehr effektiven und genauen Erkennung der Partiellen Taubährigkeit ab einem Befallsgrad von mindestens 5% und einer Differenzierungsgenauigkeit von 10%. Die Chlorophyllfluoreszenz-Bildanalyse war unter Freilandbedingungen bei Einhaltung der Rahmenbedingungen (keine direkte Sonneneinstrahlung) zur *Fusarium*-Erkennung ebenfalls möglich, wenn auch mit schlechteren Erkennungsraten.

Die Aufnahmen im Labor mit einem hyperspektralen Bildanalysesystem im Spektralbereich von 400-1000 nm zeigten Unterschiede in distinkten Wellenlängenbereichen und lassen die Erkennung kranker Ähren in einem Zeitfenster von BBCH 71 bis BBCH 85 zu. Die bildanalytische Klassifizierung mittels des „Spectral Angle Mapper“ liefert gute Ergebnisse, ist aber sehr zeitaufwändig. Alternativ dazu nutzt der neu erstellte head blight-Index (HBI) die spektralen Unterschiede im Bereich 665-675 nm und 550-560 nm und kann eine feldtaugliche Klassifizierungsmöglichkeit zur Erkennung von Partieller Taubährigkeit sein.

Schlagwörter:

zerstörungsfreie Detektion, *Fusarium culmorum*, F_v/F_m , spectral angle mapper

Abstract (englisch)

Fusarium infections are serious problems in wheat production. Mycotoxins, synthesised by the fungi, are toxic and harmful in both human and animal nutrition. The symptoms of this so-called head blight disease caused by *Fusarium spp.* are recognizable by various image analysis methods prior to harvest. Using this information, farmer could differently utilize affected cereals, if necessary.

Healthy and artificially *Fusarium culmorum*-infected wheat plants were analyzed with a chlorophyll fluorescence and hyper-spectral imaging system in time series.

With chlorophyll fluorescence imaging (CFA), the potential maximum photochemical efficiency (F_v/F_m) and its spatially variable distribution was analyzed to determine the interactions between the degree of disease and the photosynthetic activity. By means of this method, early recognition was reliably achieved by a decreased photochemical efficiency in diseased ears between 6th and 11th day after inoculation. The degree of disease correlated with photochemical efficiency. At a degree of *Fusarium* infection of 5% and higher, calculation of the cumulative F_v/F_m at 0.3 enabled a very effective and precise determination of *Fusarium* head blight with a differentiation accuracy of at least 10%.

Though less effective, CFA successfully detected head blight under outdoor conditions, if some boundary conditions (e.g. no direct solar irradiation) were observed.

In the laboratory, a hyperspectral imaging system (wave length range 400 to 1000 nm) indicated specific spectral differences between affected and unaffected wheat ears. These differences allowed head blight recognition during BBCH 71 to BBCH 85. Imaging classification with the "Spectral Angle Mapper" method achieved good results; it is, however, very time-consuming. Alternatively, the newly derived head blight index (HBI), using spectral differences in the wave length ranges of 665 to 675 nm and 550 to 560 nm, can be a suitable outdoor classification method to evaluate head blight.

Keywords:

non-invasive detection, *Fusarium culmorum*, F_v/F_m , spectral angle mapper

Inhaltsverzeichnis

Abstract (deutsch)	3
Abstract (englisch)	4
Abkürzungs- und Synonymverzeichnis	9
Verzeichnis der verwendeten Zeichen und Indices	12
1 Einleitung	16
1.1 Problematik der Partiellen Taubährigkeit	16
1.2 Krankheitsbild von <i>Fusarium</i> -Infektionen an Weizenpflanzen	18
1.3 Technische Möglichkeiten zur Erkennung von <i>Fusarium</i> -Mykotoxinen	21
1.3.1 Raman-Spektroskopie	21
1.3.2 Kernspintomographie.....	22
1.4 Technische Möglichkeiten zur Erkennung von <i>Fusarium</i> -Infektionen aufgrund von visuellen Symptomen bzw. physiologischer Parameter	23
1.4.1 Thermographie	24
1.4.2 Chlorophyllfluoreszenz	25
1.4.2.1 Prinzipien der Chlorophyllfluoreszenz-Messung	25
1.4.2.2 Messung der Chlorophyllfluoreszenzkinetik	27
1.4.2.3 Chlorophyllfluoreszenzanalyse (CFA) zur Erkennung physiologischer Veränderungen bei Umweltstress	30
1.4.2.4 CFA als Methode zur Krankheitserkennung.....	31
1.4.2.5 Vorteile der Chlorophyllfluoreszenzbildanalyse.....	33
1.4.3 Reflexionsbasierte Aufnahmemethoden.....	34
1.4.3.1 RGB-Aufnahmen	35
1.4.3.2 Multispektralaufnahmen	35
1.4.3.3 Hyperspektralaufnahmen im VIS (400-700 nm) und NIR-Bereich (700- 3000 nm).....	37
1.5 Zielstellung der Arbeit.....	39
2 Material und Methoden	41
2.1 Pflanzenmaterial	41
2.2 Experimentelle Durchführung	41
2.2.1 Chlorophyllfluoreszenzbildanalyse	42
2.2.1.1 Aufbau des Messplatzes für Laboruntersuchungen	42

2.2.1.2	Statistische Auswertung der CFA-Daten	44
2.2.1.3	Messungen im Freiland	44
2.2.2	Hyperspektrale Messungen	46
2.2.2.1	Aufbau des Messplatzes	46
2.2.2.2	Datenanalyse (Hyperspektraldaten)	47
2.2.2.3	Evaluierung relevanter Wellenlängenbereiche (zur Bildung eines HBI-Indexes)	48
2.2.2.4	Klassifizierung mit der „Spectral Angle Mapper“ Methode	50
3	Ergebnisse	53
3.1	Rapid <i>Fusarium</i> head blight detection on winter wheat ears using chlorophyll fluorescence imaging	53
3.2	Early detection of <i>Fusarium</i> infection in wheat using hyper-spectral imaging ...	62
3.3	Hyperspectral and chlorophyll fluorescence imaging to analyse impacts of <i>Fusarium culmorum</i> on photosynthetic integrity of infected wheat ears	72
3.4	Detection of head blight (<i>Fusarium</i> spp.) at ears of winter wheat using hyperspectral and chlorophyll fluorescence imaging	88
3.5	Einfluss der Reife auf die maximale photochemische Effizienz (F_v/F_m)	101
3.6	Detektionsgenauigkeit der Hyperspektralaufnahmen	101
3.7	Bestimmung des DON-Gehaltes	103
4	Gesamtbetrachtung und Ausblick	105
4.1	Chlorophyllfluoreszenzanalyse	105
4.2	Hyperspektrale Bildanalyse	109
4.3	Ausblick	114
4.3.1	Vergleich zwischen Chlorophyllfluoreszenz- und Hyperspektralanalyse 114	
4.3.2	Auswertungsansätze zu Chlorophyllfluoreszenz- und spektralen Messungen	115
4.3.3	Verbesserung der Krankheitserkennung mit verknüpften Sensoren...	116
4.3.4	Zukunftsvisionen	117
5	Zusammenfassung	118
6	Summary	120
7	Literaturverzeichnis	122

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: links: Makrokonidien von *Fusarium culmorum* in 800facher Vergrößerung (Quelle: SAMSON et al. 1995), rechts: rötliches Myzel des Pilzes (Keimbestimmung infizierter Körner des Versuches 2) 19

Abbildung 2: Überblick über drei mögliche Fluoreszenzmessprinzipien bei grünem Pflanzenmaterial. Es wird (a) das gesamte Fluoreszenzspektrum über einen festgelegten Wellenlängenbereich erfasst, (b) die Intensität der Fluoreszenz bei einer Wellenlänge oder einem engen Wellenlängenbereich gemessen in Abhängigkeit des Fluoreszenzsignales von der Chlorophyllkonzentration C_{chl} oder (c) die zeitliche Veränderung des Fluoreszenzsignals analysiert, wobei aktinisches Licht (E) den physiologischen Zustand des Blattes über die Zeit (t) verändert (verändert nach THIESSEN 2002). 26

Abbildung 3: Fluoreszenzinduktionskurve, sogenannter Kautsky-Effekt: a und a': An- bzw. Ausschalten des Messlichtes; b und b': An- bzw. Ausschalten des aktinischen Lichtes; O: Grundwert F_0 ; I: erstes Maximum F_I ; D: Anstieg im Schulter-Bereich; P: Spitzenwert (Peak), bei Gabe eines sättigenden Lichtimpulses entspricht P auch M, der maximalen Fluoreszenz, T: Endwert, Abfall der Fluoreszenz auf einen relativ konstanten Endwert (T von terminal = Endstadium) (VON WILLERT et al. 1995). 27

Abbildung 4: Typischer Chlorophyllfluoreszenz-Signalverlauf bei Verwendung der Sättigungspulsmethode (SP = Sättigungslichtimpuls) (HERPPICH 2001). Der grün unterlegte Bereich hebt die tatsächlich gemessenen und ausgewerteten Parameter hervor..... 29

Abbildung 5: Aufbau des Chlorophyllfluoreszenzmessplatzes; [1] LED-Felder (Messlicht); [2] Halogenleuchte; [3] CCD-Kamera..... 43

Abbildung 6: Feldmessungen mit der FluorCam MF700. 45

Abbildung 7: Beispielaufnahme einer CFA-Messung im Feldbestand (links: Messapparatur, rechts: Ergebnisbild einer gemessenen Ähre). Die ermittelten photochemischen Effizienzen sind den entsprechenden Gewebebereichen innerhalb der Ähre in einem Falschfarbenbild (blau-niedrig, rot-hoch) zugeordnet. 46

Abbildung 8: Komponenten des Hyperspektralmessplatzes; [1] stabilisierte Lichtquelle / Halogenlampe; [2] Zeilenlicht; [3] Winkelscanner / Drehspiegeleinheit; [4] Spektrograph (ImSpector V10E); [5] 12-bit schwarz/weiß-Kamera; [6] Aufnahmesteuerung über Software HyBis. 47

Abbildung 9: Kranke (helle) und gesunde (grüne) Ährenbereiche sind visuell gut im RGB-Bild unterscheidbar und zeigen dementsprechend auch unterschiedliche Spektren (gesunder Bereich: oben und kranker Gewebebereich: unten). Das Zoombild (mittig) erleichtert die genaue Zuordnung. 48

Abbildung 10: Originalspektren, Darstellung je 10 gesunder und kranker Gewebebereiche und des roten Myzels als zusätzliches Merkmal Partieller Taubährigkeit. 49

Abbildung 11: Erste Ableitung der Spektren von gesunden bzw. fusariumbefallenen Geweben und von rotem Myzel (Beispielspektren).....	50
---	----

Abbildung 12: Schematische Darstellung des „Spectral Angle Mapper“ – Klassifikationsalgorithmus. Band I und J stellen Beispielbänder dar (ENVI 2010).	51
---	----

Abbildung 13: Kumulative Anteile von F_v/F_m bei 0,3 (in %) bei vorzeitig gereiften Kontrollpflanzen (UK1-1, UK1-3, UK1-4; grüne, unterbrochene Linien), an <i>Fusarium</i> erkrankten Weizenpflanzen (I2-11, I2-12, rote Linien) und Kontrollpflanzen mit normalem Entwicklungsverlauf und beginnender Reife ab 21. dai.	101
--	-----

Abbildung 14: Anteil der unklassifizierten Pixel steigt im Zeitverlauf. Klassifizierung des Versuches 2 mit SAM (Threshold 0,1; Maskensetzung; n=3, am Beispiel I1 A1_9_10).	102
---	-----

Abbildung 15: Zunahme der Abweichungen zwischen bonitiertem und klassifiziertem Befall bei fortschreitender Reife (BBCH 77/79 hellgrün, BBCH 85 bis 89 dunkelgrün unterlegt) sowohl für Kontroll- als auch infizierte Pflanzen, Daten aus zwei Zeitreihenversuchen.	102
--	-----

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammenstellung der unterschiedlichen Mykotoxine, die von den einzelnen <i>Fusarium</i> -Arten gebildet werden können (nach MIL, 2010).....	16
---	----

Tabelle 2: Anwendungsmöglichkeiten der CFA, hauptsächlich mittels F_v/F_m -Wert.....	32
--	----

Tabelle 3: Datenbasis zur Bestimmung der relevanten Wellenlängenbereiche	49
--	----

Tabelle 4: Mittlere absolute Abweichungen der Residuen bei den beiden Klassifikationsmethoden SAM und HBI bei unterschiedlichen Aufnahmezeitspannen ...	103
---	-----

Tabelle 5: Mittlere DON-Gehalte der Körner der untersuchten Probenklassen aus dem Zeitreihenversuch im März 2008 (Versuch 2). Alle Werte, die den Höchstgehalt für DON in Getreide überschreiten, sind fett hervorgehoben.	103
---	-----

Tabelle 6: Mittlere DON-Gehalte der Körner der untersuchten Probenklassen aus dem Zeitreihenversuch im September 2008 (Versuch 3).	104
---	-----

Abkürzungs- und Synonymverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
AL	aktinisches Licht
Band	üblicher Term in der Bildverarbeitung. Ein Band entspricht einem bestimmten Wellenlängenbereich mit der vom Messsystem festgelegten Wellenlängenbreite
BBCH	abgeleitet von Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Bundessortenamt und Chemische Industrie; definierte Skala zur Beurteilung des Entwicklungsstandes von Kulturpflanzen
CCD-Kamera	Kamera mit lichtempfindlichen elektronischen Bauelementen (charge-coupled device)
CFA	Chlorophyllfluoreszenzanalyse
dai	days after inoculation (Tage nach Inokulation)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dod	degree of disease (Befallsgrad)
DON	Deoxynivalenol
EC	Entwicklungscode, Wachstumsstadium
F_m	maximale Fluoreszenz
$F_{m'}$	momentane maximale Fluoreszenz
F_0	Grundfluoreszenz
$F_{0'}$	momentane Grundfluoreszenz
F_t	terminales steady state Fluoreszenzsignal unter aktinischer Beleuchtung
F_v	variable Fluoreszenz
$F_{v'}$	momentane variable Fluoreszenz
$\Delta F_m/F_{m'}$	nichtphotochemische Energiedissipation
F_v/F_m	potentielle maximale photochemische Effizienz von Photosystem II: Verhältnis aus variabler und maximaler Fluoreszenz
GPS	globales Navigationssatellitensystem v. a. zur Positionsbestimmung (global positioning system)

HBI	head blight index
head blight	englisches Synonym für Partielle Taubährigkeit
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)
HSA	Hyperspektralanalyse
inf.	infiziert
Kanal	Ein aufgenommener Wellenlängenbereich entspricht bei den Multispektralkameras einem Kanal. In der Bildanalyse werden oft Kanal, Band und Wellenlänge synonymisiert verwendet, obwohl technische Gegebenheiten wie Auflösungsvermögen diesem widersprechen.
LED	lichtemittierende Dioden
ML	Messlicht
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NDVI	normalized difference vegetation index
NMR	nuclear magnetic resonance = Kernspinresonanz
NIR	Nahinfrarot (700-3000 nm)
MRI	Magnetic Resonance Imaging = Kernspintomographie
PCA	principal component analysis
PC	Hauptkomponente(n); principal component(s)
PLS	partial least squares
PS I	Photosystem I
PS II	Photosystem II
Q _A	primärer Elektronenakzeptor des PS II
q _E	energieabhängige Fluoreszenzlöschung (quenching)
q _N	nichtphotochemische Fluoreszenzlöschung (quenching)
q _P	photochemische Fluoreszenzlöschung (quenching)
rel.	relativ
RGB	Rot-Grün-Blau

RMSE	root mean square error, Wurzel des mittleren quadratischen Fehlers
ROI	„regions of interest“ – Bildausschnitte, die von Interesse sind, z.B. Bereiche, die Symptome bzw. Veränderungen zeigen
R ²	Bestimmtheitsmaß
SAM	spectral angle mapper
sod	severity of disease
SP	Sättigungsimpuls
spp.	species pluralis
UK	unbehandelte Kontrolle
UV	ultravioletter Bereich des Lichtes (ca. 200-380 nm)
VIS	Visueller Bereich des Lichtes (400-700 nm)
Y(NO)	Ertrag (yield) der nichtregulierten Energiedissipation im PS II
Δ	Schrittweite, Klassenbreite
Φ _{II}	Parameter zu Messung der aktuellen photochemischen Effizienz von PS II, entspricht $\frac{F_{m'} - F_t}{F_{m'}}$
λ	Wellenlänge

Verzeichnis der verwendeten Zeichen und Indices

\overline{B}	mittlerer Befall
B_i	prozentualer Befall des Teilstückes zum i-ten Boniturtermin
B_{i+1}	Anzahl der Tage zwischen dem i-ten und (i+1)-ten Boniturtermin (Boniturabstand)
$\cos \alpha$	cosinus des spektralen Winkels α
d_i	Anzahl der Tage zwischen dem i-ten und (i+1)-ten Boniturtermin (Boniturabstand)
D	Anzahl der Tage zwischen dem ersten und t-ten Boniturtermin (Boniturzeitraum)
F_m	maximale Fluoreszenz
$F_{m'}$	momentane maximale Fluoreszenz
F_0	Grundfluoreszenz
$F_{0'}$	momentane Grundfluoreszenz
F_t	terminales steady state Fluoreszenzsignal unter aktinischer Beleuchtung
F_v	variable Fluoreszenz
$F_{v'}$	momentane variable Fluoreszenz
$\Delta F_m/F_{m'}$	nichtphotochemische Energiedissipation
F_v/F_m	potentielle maximale photochemische Effizienz von Photosystem II: Verhältnis aus variabler und maximaler Fluoreszenz
$\left(\frac{F_v}{F_m} \right)_{kum0,3}$	kumulativer Wert bei 0,3 der potentiellen maximalen photochemischen Effizienz
i	Klasse
k	Korrekturwert
nb	Laufvariable, Zahl der Bänder
r	spektrale Signatur der Klasse i oder j des Trainingsbildes (Referenzpixel)

t	spektrale Signatur der Klasse i oder j (Zielpixel)
x_{ij}	Wert bei j-tem Spektrum und i-ter Wellenlänge
α	spektraler Winkel α
Δ	Schrittweite, Klassenbreite
Σ	Summation
Φ_{II}	Parameter zu Messung der aktuellen photochemischen Effizienz von PS II,

entspricht $\frac{F_{m'} - F_t}{F_{m'}}$

Das gute Gelingen ist zwar nichts Kleines, fängt aber mit Kleinigkeiten an.

Sokrates

1 Einleitung

1.1 Problematik der Partiellen Taubährigkeit

Ziel einer modernen Landwirtschaft ist es nicht nur, die Erträge zu steigern und zu optimieren, sondern qualitativ hochwertige und gesunde Lebens- und Futtermittel zu produzieren. In diesem Zusammenhang stellen speziell Fusarien-Infektionen an Getreide ein wichtiges, stetig wachsendes Problem dar. *Fusarium*-fördernde Anbauformen wie z. B. verstärkter Maisanbau werden das Problem in Zukunft sicherlich noch wesentlich verschärfen. Weltweit kam es in den letzten Jahren zu einem Anstieg von Fusarien-Infektionen. Ernteaufälle bis zu 30% (SHANER 2005) sind bezeichnend für das enorme Ausmaß der Krankheit.

Dabei sind die Arten *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* und *F. avenaceum* die häufigsten Erreger der Ährenfusariosen bei Getreide (PARRY et al. 1995, SHANER 2005). Ihr Vorkommen kann teilweise auf kleinstem Raum variieren (SOMMER et al. 2010). Die ausgeschiedenen Mykotoxine und Derivatformen sind artabhängig (vgl. Tab. 1)

Tabelle 1: Zusammenstellung der unterschiedlichen Mykotoxine, die von den einzelnen *Fusarium*-Arten gebildet werden können (nach MIL, 2010)

<i>Fusarium</i>-Art	Bildung von Mykotoxinarten
<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. cerealis</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. poa</i>	Deoxynivalenol (DON), Nivalenol (NIV), 3-Acetyl-DON (Typ-B Trichothecene), 15-Acetyl-DON (Typ-B Trichothecene)
<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. cerealis</i> , <i>F. equiseti</i>	Zearalenon (ZEA), α - und β -Zearalenol
<i>F. verticilliodetes</i> , <i>F. proliferatum</i>	Fumonisine (vier strukturell ähnliche: B1 bis B4) B1 besonders toxisch

Ein äußerlich sichtbares und typisches Symptom eines Befalls durch *Fusarium*-Pilze ist das partielle Absterben von Ährenbereichen. Genau dies gab dieser Pilzerkrankung auch den Namen: „Partielle Taubährigkeit“. Als direkte Folge führt eine *Fusarium*-Infektion zu erheblichen Ernteverlusten. Am problematischsten sind die möglichen toxischen Begleiterscheinungen der Erkrankung. Hoch kontaminierte Getreidepartien sind erwiesenermaßen für Tier und Mensch gesundheitsschädlich und gefährlich. Fusarien produzieren in unterschiedlicher Stärke Mykotoxine wie Deoxynivalenol (DON), Zearalenon und Fumonisine (DELWICHE 2003, RAGAB et al. 2005, DLG-ARBEITSGRUPPE „MYKOTOXINE“ 2000).

Das Deoxynivalenol, auch als Vomitoxin bekannt, gehört zur Gruppe der Typ B-Trichothecene. Trichothecene hemmen stark die Proteinsynthese (PESTKA 2010). Infolgedessen erhöht das Gehirn die Aufnahme der Aminosäure Tryptophan und die Synthese von Serotonin. Man glaubt, dass die erhöhte Konzentration von Serotonin für die anorektischen Effekte der Trichothecene verantwortlich ist (PESTKA und SMOLINKI 2005). Deoxynivalenol und dessen Derivate führen v.a. bei Schweinen zu Futterverweigerung, Erbrechen, Rückgang an Lebendmassezunahme und Wachstumsverzögerungen (MIL 2010).

Zearalenon wird aufgrund seines Aufbaues (ringförmiges Molekül mit einer intramolekularen Estergruppe) als Makrolid und Resorcylsäure-Derivat eingeordnet (ANONYMUS 2011a). Zearalenon und dessen Derivate wirken hormonell und werden im menschlichen und tierischen Organismus an den Östrogenrezeptoren gebunden (DÄNICKE et al. 2006). Durch den überhöhten Östrogen-Spiegel kommt es zu Fruchtbarkeitsstörungen, Deformationen der Sexualorgane sowie verminderten Wurfstärken und mehr Totgeburten (AID 1990).

Auch beim Menschen kommt es zu Störungen des Menstruationszyklus, zu Veränderungen an den Ovarien, zu Scheinschwangerschaften, Aborten und Sterilität. Möglicherweise könnte Zearalenon auch vorzeitige pubertäre Veränderungen bei Kindern auslösen. Durch seine Östrogenwirkung hat es Einfluss auf die Tumorbildung hormonell empfindlicher Gewebe (z. B. Brustkarzinom) (MASSART und SAGGESE 2010).

Fumonisine sind aliphatische Kohlenwasserstoffe mit einer terminalen Aminogruppe sowie zwei Tricarbonsäureseitenketten (DÄNICKE et al. 2006). Sie unterbinden die Ceramid-Synthese, indem sie die Übertragung von Acyl-Gruppen auf Sphingosin behindern (MERRILL et al. 1996). Sie sind chemisch relativ beständig und können nicht wie DON durch verschiedene Verarbeitungsschritte (Erhitzen, Backen) um- bzw. abgebaut werden. Fumonisine sind leber- und nierenschädigend und stehen im Verdacht, kanzerogen zu sein und zur Entstehung von Leber-, Ösophagus- und Vormagenkrebs beim Menschen beizutragen (GELDERBLOM et al. 1988, KUIPER-GOODMAN 1995, MIL 2010).

Zum Schutz der Verbraucher sind mittlerweile EU-weit Verordnungen in Kraft, die den Umgang mit kontaminierten Getreidechargen regeln und die zulässigen Höchstgehalte der Mykotoxine festlegen (VO (EG) 1881/2006 bzw. VO (EG) Nr. 1126/2007, in RAUPPACH und MARGGRAF 2009). Nach diesen Richtlinien gilt seit dem 01.03.2007 ein generelles Verschneidungsverbot, d. h. kontaminiertes Getreide darf nicht mehr mit unbelastetem Getreide vermischt werden, um den Toxingehalt der Gesamtcharge zu senken. Hinzu kommt, dass sich die Mykotoxinbildung im Getreidelager bei hoher Feuchte und Temperaturen von 12 bis 25 °C fortsetzen kann. Dadurch erhöht sich der Druck auf Bauern und Lebensmittelproduzenten, befallenes Getreide zu erkennen und aus der Nutzung als Nahrungs- und Futtermittel auszuschließen. Infiziertes Getreide darf grundsätzlich weder in den menschlichen noch tierischen Ernährungskreislauf gelangen.

Eine sinnvolle Verwertungsalternative für belastetes Getreide könnte z. B. die Energiegewinnung in Biogasanlagen darstellen. In einem Screening zur Inaktivierbarkeit ausgewählter Phytopathogene fanden POTTBERG et al. (2010), dass *Fusarium avenaceum*, *F. culmorum*, *F. verticillioides* unabhängig davon, ob Getreide oder Maissubstrat verwendet wurde, nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden phytohygienisch unbedenklich sind. Nach vorheriger Silierung des *Fusarium graminearum*-belasteten Getreides konnten nach zwei Tagen Fermentationsprozess im Biogasreaktor keine überlebenden *Fusarium*-Keime mehr gefunden werden (SEIGNER et al. 2010). Nach bisherigen Erkenntnissen kann Fusarien- bzw. DON-kontaminiertes Getreide sowohl in den Flüssigfermentationsanlagen als auch in der Feststofffermentation als Substrat eingesetzt werden (MIL 2010).

Dessen ungeachtet wäre es ein Fortschritt, *Fusarium*-Infektionen durch Verwendung einfacher Methoden schon auf dem Feld zu identifizieren. Dies würde den Produzenten die Möglichkeit geben, befallende Bestände getrennt vom gesunden Getreide zu ernten. Auch eine gemeinsame Einlagerung von unbelasteten und kontaminierten Getreidechargen könnte so vermieden werden. Da sich die Ver- und Ausbreitung der

Fusarienpilze ebenso wie die Mykotoxinbildung im Getreidelager bei entsprechenden Bedingungen fortsetzen kann, ist eine getrennte Beerntung umso sinnvoller. Das Risiko einer Mykotoxinvergiftung von Lebensmitteln könnte so verringert und eine sinnvolle Nutzung von *Fusarium*-belastetem Erntegut erleichtert werden.

Bislang fehlen hierfür allerdings schnelle und umfassende Erkennungsmethoden. In der Praxis war und ist (!) es üblich, die Getreidepartien erst zum Zeitpunkt der Ernte auf eine mögliche Mykotoxinbelastung zu testen bzw. deren Mykotoxingehalte zu bestimmen. Hierfür sind sehr zeitaufwändige und teure Labortests zum Zeitpunkt der Ernte notwendig (HPLC, serologische Schnelltests, Fast-DON-ELISA, Auszählmethode; THATE et al. 2008).

Eine automatisierte und zuverlässige Fusarienerkennung wird somit dringend notwendig, da einerseits die Infektionen zunehmen, andererseits die gesetzlichen Bestimmungen verschärft wurden. Die Produzenten warten auf innovative Erkennungsmethoden bzw. –geräte. Hier setzt die vorliegende Arbeit an und zeigt die Möglichkeiten und Grenzen der verwendeten Bildanalysemethoden bei der Erkennung der Partiellen Taubähigkeit.

1.2 Krankheitsbild von *Fusarium*-Infektionen an Weizenpflanzen

Ging man früher davon aus, dass Fusarien generell nekrotrophe Pathogene sind, die den Wirt relativ schnell abtöten (perithotrophe Lebensweise), so zeigen neuere Untersuchungen ein differenzierteres Bild. In zytologischen Untersuchungen des Vertreters *Fusarium graminearum* an Weizen erklären BROWN et al. (2010) das anfängliche asymptomatische Stadium mit einer zunächst biotrophen, noch nicht die Zellstrukturen der Wirtszelle zerstörenden Lebensweise. Sobald die Pilzhyphe sich aber neben der interzellulären Besiedlung auch noch intrazellulär ausbreiten, beginnt die Schädigung und Auflösung der Wirtszellwände, was zum Tod der Wirtszellen führt. Dieses nekrotrophische Stadium ist an makroskopischen Symptomen sichtbar.

Fusarien sind in die systematisch heterogene Gruppe der Schimmelpilze einzuordnen und gehören zur Klasse der Ascomyceten (Echte Schlauchpilze). Die Gattung *Fusarium* besitzt mit 140 Arten eine sehr große Artenvielfalt, bei der 17 Arten Ährenfusariosen hervorrufen. Wirtspflanzen sind Weizen, Gerste, Hafer, Roggen, Triticale und Mais (PARRY et al. 1995).

Während in den wärmeren südlicheren Lagen Deutschlands *F. graminearum* sehr häufig dominiert, sind im kühleren Nord- und Mitteldeutschland vielfach *F. culmorum*-Infektionen zu beobachten (LIENEMANN 2002, MIELKE 1995, SCHLÜTER et al. 2006).

Fusarien-Sporen sind leicht sichelförmig, rosa-rötlich und mit mehreren Zellwänden unterteilt (Abb. 1). Anhand dieser Formmerkmale ist eine mikroskopische Bestimmung verschiedener Arten möglich (KÜCK et al. 2009).



Abbildung 1: links: Makrokonidien von *Fusarium culmorum* in 800facher Vergrößerung (Quelle: SAMSON et al. 1995), rechts: rötliches Myzel des Pilzes (Keimbestimmung infizierter Körner des Versuches 2)

Hauptinfektionsweg ist bei den meisten Fusarienarten die Blüteninfektion über windverbreitete Askosporen. Auf den Blättern der Wirtspflanzen kann auch eine symptomlose Vermehrung der Askosporen stattfinden, von denen dann die entwickelten Konidiosporen durch Regenspritzer oder Wind freigesetzt werden und in die Blüten gelangen (OBST und GEHRING 2002).

Daneben scheint auch eine bodenbürtige Infektion über Chlamydosporen oder befallene Pflanzenreste mit *F. culmorum* möglich (SCHLÜTER et al. 2006). Gerade eine veränderte Anbaupraxis mit vermehrtem Maisanbau und auf dem Feld verbleibenden Stoppelresten erhöht die *Fusarium*-Sporendichte, da der Mais ebenfalls Wirtspflanze für *Fusarium* ist. Im verbliebenen Pflanzenmaterial oder im Boden überwintern die dickwandigen Dauerformen (Chlamydosporen). Erfolgt die Aussaat in einem *Fusarium*-infizierten Saatbett, stirbt der Keimling noch im Boden oder während des Auflaufens ab. Auch kurzstrohige Sorten sind gefährdet. So kann bei diesen Sorten das *Fusarium*-Myzel leicht in die Bestockungsknoten und in die Halmbasis eindringen. Der Pilz erschwert den Nährstofftransport von den Wurzeln in die oberen Pflanzenteile, so dass die Blattscheiden verbräunen. Auch zu einem späteren Entwicklungszeitpunkt der Weizenpflanzen können *Fusarium*-Erreger von der Halmbasis ausgehend akropetal, d. h. von der Basis zur Spitze fortschreitend, in den Pflanzen hochwachsen. Dies erklärt die hohen DON-Belastungen auch in einem für Ähreninfektionen untypischen Jahr wie im Jahr 2003, wo eine trockene und kühle Witterung im Frühjahr herrschte (SCHLÜTER et al. 2006).

Das typische Erscheinungsbild mit partiell abgestorbenen Ährenbereichen tritt nach einer Blühinfektion auf. Für eine Infektion benötigt *F. graminearum* bei 25 °C mindestens 24 Stunden Feuchtigkeit, bei 20 °C etwa doppelt so viel, unterhalb 15 °C ist eine Infektion nur bei hoher Sporendichte und mehrtägiger Nässe möglich. *F. culmorum* und *F. avenaceum* sind etwas kältetoleranter (OBST und GEHRING 2002). Dabei wächst der Pilz allmählich schlauchförmig in das Pflanzengewebe. Er zerstört durch intrazelluläres Wachstum die Wirtszellen, zuerst die nicht lignifizierten Zelltypen ohne sekundäre Zellwand, wie die Parenchymzellen der Deckspelze und der Ährchenachse, sowie die Phloemzellen und das Gefäßparenchym der Blütenstandsachse (BROWN et al. 2010). Die

pflanzliche Nährstoffversorgung sowie die Stoffwechselprozesse (v. a. Photosynthese) werden gestört und kommen allmählich zum Erliegen. Dies zeigt sich dann symptomatisch an den Pflanzen durch Chlorophylldefekte und einem partiellem Ausbleichen oder Absterben der Ähre, die dann sowohl infiziertes als auch pilzfreies Kümmerkorn enthält. Teilweise ist die Spindel braun-violett verfärbt und/oder an den Spelzen ist ein rötlicher Belag (Sporenlager) sichtbar. Die ausgelösten Körner können deformiert, verschrumpelt und ebenfalls mit einem rosa-rötlichen Belag überzogen sein.

Dabei scheint der Pilz variabel entweder in die pilzliche Biomasse oder in die Bildung von Mykotoxinen zu investieren, was die Tatsache erklären kann, dass fast symptomlose Ähren hohe DON-Gehalte aufweisen können. GÖDECKE und VON TIEDEMANN (2010) fanden bei ihren Untersuchungen, dass trotz steigendem DON-Gehalt und DNA-Mengen eine Verringerung der spezifischen Mykotoxinbildung (spezifische DON-Bildung pro pilzliche Biomasse) festzustellen ist. Für die Höhe der Mykotoxinbildung sind v. a. die Standortfaktoren bzw. Umweltbedingungen ausschlaggebend, auch der Zeitraum für die Mykotoxinakkumulation spielt eine wesentliche Rolle. So haben die Pilze einen längeren Zeitraum für die Mykotoxinakkumulation bei spätreifenden Sorten oder bei dem Pflanzenschutzmitteleinsatz mit Strobilurin (GÖDECKE und VON TIEDEMANN 2010).

Auf zellulärer Ebene konnten KANG und BUCHENAUER (2000a) zeigen, dass die Makrokonidien des Pathogens 6-12 h nach Inokulation auf allen Wirtsoberflächen keimen. Die Hyphen wachsen und verzweigen sich auf der Oberfläche des Wirtsgewebes und sind dann meist 2 Tage nach Inokulation auf der inneren Oberfläche der Deck-, Hüll- und Vorspelzen nachweisbar. Danach breitet sich der Pathogen beidseits in der Ährenspindel (nach oben und unten) durch inter- und intrazelluläres Wachstum aus (BROWN et al. 2010).

Wenn das Pathogen die Ährenspindel 4 bis 5 Tage nach Infektion erreicht hat, wachsen die Hyphen inter- und intrazellulär in das Leitbündel und das Rindenparenchym der Ährenspindel hinein und setzen sich dort fest (KANG und BUCHENAUER 2000a). Mit rasterelektronischen Aufnahmen konnten die zytologischen Veränderungen der Wirtszellen gezeigt werden. Sobald die Pilzhypen intrazellulär in das Wirtsgewebe eindringen, beginnt die Phase der nekrotrophen Lebensweise mit der Degeneration des Wirtszytoplasmas und der Zellorganellen. Die Parenchymzellen kollabieren und die Zellwände werden teilweise zersetzt und verdaut. Damit schnürt der Erreger ab Höhe der Primärinfektion die Leitbahnen ab, womit die Wasser- und Nährstoffversorgung unterbunden ist. Krankheitssymptome werden äußerlich sichtbar, wohingegen die Mehrheit der Frühinfektionen (<5 Tage) symptomlos bleiben (BROWN et al. 2010).

Nach KANG und BUCHENAUER (1999) produzieren die an der Oberfläche der Deckspelze und des Fruchtknotens wachsenden Pilzhypen frühestens 36 h nach Inokulation Mykotoxine. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Toxine auch in den Parenchymzellen gefunden. Nachdem die Hyphen in das Wirtsgewebe eingedrungen waren und sich dort weiter ausgebreitet hatten, wurden erhöhte Mykotoxingehalte in den Wirtszellen nachgewiesen, besonders in Zellen mit unmittelbarem Kontakt zu den Hyphen. Die Toxinakkumulation zeigte eine sehr enge Beziehung mit den pathogenetischen Veränderungen in den Wirtszellen. Das Erscheinen von Symptomen und die Kolonisation der Wirtsgewebe mit den Hyphen deuten darauf hin, dass die Toxine eine wichtige Rolle in der Krankheitsentwicklung spielen könnten (KANG und BUCHENAUER 1999).

Zurzeit gibt es noch keine *Fusarium*-resistenten Winterweizensorten, wenn auch in den letzten Jahren viele weniger anfällige Sorten gezüchtet wurden (LELF 2010, MIEDANER et al. 2003, MIEDANER und SCHNEIDER 2002). Die resistenteren Sorten zeigten in

elektronenmikroskopischen Untersuchungen (KANG und BUCHENAUER 2000b) strukturelle Abwehrreaktionen. So war bei diesen eine stärkere Einlagerung von Lignin in den Zellwänden der infizierten Weizenährchen zu finden. Möglicherweise kann durch diesen Abwehrmechanismus in einem frühen Stadium der Infektion eine Anhäufung von DON-Toxin im Gewebe der infizierten Ährchen der resistenten Sorten vermindert werden.

Im ökologischen Anbau ist der Krankheitsdruck im Vergleich zum konventionellen Anbau nicht so stark. Die hier eingesetzten langhalmigen Sorten sind weniger fusarien anfällig (BARTELS und RODEMANN 2003) und durch den Verzicht auf mineralische N-Düngung senken auch die verringerten Bestandsdichten die Krankheitsausbreitung (BLE, 2011). Für den konventionellen Anbau wurde ein Risikoschema entwickelt, bei dem einzelne Risikofaktoren aufsummiert werden. Erreichen die Faktoren „durchschnittlicher Niederschlag im Juni und Juli“, „Bestellweise“, „Vorfrucht“, „Sorte“, „Strohstruktur“ eine bestimmte Faktorensomme, wird eine vorbeugende Fusariumbehandlung Mitte bis Ende der Blüte mit verschiedenen Azol-Fungiziden empfohlen (LANDWIRTSCHAFTSKAMMER NORDRHEIN-WESTFALEN 2009). Die DON-Gehalte können so um 50-80% gesenkt werden (MIL 2010).

1.3 Technische Möglichkeiten zur Erkennung von *Fusarium*-Mykotoxinen

Fusarieninfektionen an Getreide lassen sich sowohl anhand der visuell wahrnehmbaren Symptome der Partiellen Taubährrigkeit als auch auf stofflicher Ebene anhand der Mykotoxinkonzentrationen nachweisen. Der Nachweis von *Fusarium*-Erkrankungen anhand gebildeter Mykotoxine erfordert hochspezialisierte, hochauflösende (bildgebende) Analyseverfahren wie u. a. die Raman-Spektroskopie oder die Kernspintomographie.

Diese Methoden werden hier vorgestellt, um einen möglichst umfassenden Überblick über momentane und zukünftig nutzbare Methoden zu gewähren. Zur Zeit und wohl auch in naher Zukunft sind die Verfahren zur Mykotoxinerkennung im Feld bzw. im Prozess der Getreideernte jedoch noch nicht ausgereift und erfordern technische Weiterentwicklungen. Gleichwohl wären aber die online-Verfahren zur tatsächlichen Mykotoxinbestimmung die essentiell notwendigen Ansätze.

1.3.1 Raman-Spektroskopie

Bei dieser Technik wird die zu untersuchende Materie mit monochromatischem Licht, üblicherweise von einem Laser, bestrahlt. Das eingestrahlte Licht wird als Streulicht reflektiert und zeigt charakteristische Spektrallinien, die gegenüber der Frequenz des eingestrahlichten Lichtes verschoben sind. Moleküle und Molekülgitter sind in ständiger Schwingung und werden durch das eingestrahlte Licht auf ein höheres oder niedrigeres Schwingungsenergieniveau gebracht (Raman-Effekt). Die dabei abgegebene oder aufgenommene Energie entspricht der Differenz zwischen zwei Energieniveaus einer Molekülschwingung (DIPPEL, 2011). Die Frequenzunterschiede zum eingestrahlichten Licht entsprechen den für das Material charakteristischen Energien von Rotations-, Schwingungs-, Phonon- oder Spin-Flip-Prozessen. Aus dem erhaltenen Spektrum lassen sich, ähnlich dem Spektrum der Infrarotspektroskopie, Rückschlüsse auf die untersuchte Substanz ziehen. Die in einem Raman-Spektrum auftretenden Linien werden auch als Stokes-Linien bezeichnet.

Die Ramanspektren geben detaillierte molekulare Informationen mit hoher räumlicher Auflösung auf zellulärer Ebene (SCHULZ und BARANSKA 2007). Sie erlauben Rückschlüsse auf verschiedenste sekundäre Pflanzenmetabolite wie Phenole, Terpenoide, Alkohole und Chlorophylle. Die Unempfindlichkeit gegenüber Wasser und bei sich überlappenden Banden der Ramanspektroskopie wird als Vorteil gegenüber der Infrarot- bzw. Nahinfrarot-Technik gesehen (LUI et al. 2009; SCHULZ und BARANSKA 2007).

Mithilfe der Raman-Technik konnten in einem schnellen und nichtzerstörenden Screening geringe und hohe DON-Kontaminationen bei Weizen- und Gerstenkörnern unterschieden werden (LUI et al. 2009). Dafür reichten zudem einfache Auswertungsalgorithmen wie die Prinzipielle Komponentenanalyse (PCA) aus.

1.3.2 Kernspintomographie

Ein weiteres, aber noch sehr teures, komplexes, jedoch zerstörungsfreies bildgebendes Verfahren ist die Kernspintomographie (engl. Magnetic Resonance Imaging, MRI). Die Kernspinresonanz oder Magnetresonanz beruht auf der Absorption bzw. Emission von elektromagnetischer Energie durch Atomkerne in einem statischen Magnetfeld nach der Anregung durch ein resonantes hochfrequentes Magnetfeld (REISER und SEMMLER 1992). Jedes Atom rotiert um sich selbst und besitzt aufgrunddessen sein eigenes winzig kleines Magnetfeld. Der Kernspin gibt den Gesamtdrehimpuls eines Atomkerns an. Bringt man ein Atom in ein starkes, äußeres Magnetfeld, zwingt man das Atom sich entlang des Magnetfeldes bzw. entgegengesetzt auszurichten. Für die Ausrichtung im Magnetfeld gibt es für jedes Atom und jede Magnetfeldstärke eine ermittelbare Larmorfrequenz. Die Atomkerne können nun mit starken Radiowellen der gleichen Frequenz im Magnetfeld ausgerichtet werden. Beim Abstellen des Radioimpulses gehen die Atomkerne wieder in ihren ursprünglichen und energetisch günstigeren Zustand und geben einen minimalen elektromagnetischen Impuls ab (ANONYMUS 2011b). Dieser hier stark vereinfacht beschriebene Vorgang wird Relaxation genannt. Für die Kernspinresonanz sind nur solche Atome mit einer Spinzahl $I=1/2$ interessant, da diese nur zwei Orientierungen besitzen. Dies ist bei ^1H , ^{13}C , ^{19}F und ^{31}P gegeben (ATKINS und DE PAULA 2006). Am meisten werden jedoch freie und gebundene Wasserprotonen mittels Magnetresonanztomographie bzw. -tomographie detektiert.

Resultat dessen ist ein NMR-Spektrum, das die Intensität gegenüber der Frequenz abbildet. Die zwei- oder dreidimensionalen Bilder geben Informationen über das Innere der Objekte und sind deshalb sehr gut zur Qualitätseinschätzung geeignet. Die NMR-Methode erfasst sehr sensitiv Konzentrationen, chemisches Milieu, Mobilität und Diffusion der Inhaltsstoffe. Dies lässt Rückschlüsse auf Zellkompartimentierung und Gewebestruktur zu (RUIZ-ALTISENT et al. 2010).

Die Kernspintomographie ist schon lange in Medizin, Materialforschung und Qualitätsanalyse etabliert und findet in den letzten zwei Jahrzehnten auch zunehmend Anwendung in Bereichen der Agrarforschung. In diesem Zusammenhang wurden erste Untersuchungen unter stationären Bedingungen zu Wasser- und Fettgehalten von Ernteprodukten durchgeführt (BAILEY und HORVAT, 1972, RUIZ-ALTISENT et al. 2010). In den letzten zehn Jahren kamen umfangreiche Analysen der inneren Qualität an verschiedenen Früchten und Gemüsesorten hinzu (HILLS und CLARK 2003; ARISTIZÁBAL 2007, HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al. 2006, 2009). Mittlerweile werden sogar sich bewegende Objekte mit Bandgeschwindigkeiten von bis zu 250 mm/s mit dieser hochsensitiven Technik untersucht. Schwierigkeiten bei diesen Messungen gibt es weniger wegen der geradlinigen Bandbewegung, sondern vielmehr durch die unterschiedliche Ausrichtung der Objekte (HILLS und CLARK 2003). Dennoch, bei 50 mm/s können schon bis zu

100%ige Erkennungsraten bei der Detektion von Kernen in Mandarinen erreicht werden (BARREIRO et al. 2008). Auch bei geringerer Arbeitsleistung und Anwendung von Schwach-Feld-Instrumenten und hoher Geschwindigkeit wurden inneres Verbräunen bei Birnen (HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al. 2007) sowie inneres Verbräunen bei Äpfeln (CHAYAPRASERT und STROSHINE 2005) hochgenau eingeschätzt (96% bzw. 88% Trefferquote).

Dass relativ wenige Arbeiten speziell zu phytopathologischen Schädigungen zu finden sind, liegt zweifellos an den hohen Kosten dieser MRI-Geräte und –untersuchungen, die vordergründig für medizinische Zwecke hergestellt wurden. Mittlerweile gibt es aber auch preisgünstigere Geräte mit weniger Arbeitsleistung, aber noch ausreichender Genauigkeit, für die Industrie (KIM et al. 2008).

Auch bei der MRI nutzt man den Umstand aus, dass sich krankes Gewebe oft wegen des niedrigeren Wassergehaltes von gesundem unterscheiden lässt. Aufgrund der unterschiedlichen Wassergehalte sind die Protonenrelaxationszeiten unterschiedlich (JOHNSON et al. 1986). Die Kernspintomographie bringt gerade auch bei phytopathologischen Fragestellungen nicht nur den Vorteil der berührungslosen Detektion, sondern kann innere Strukturen sichtbar machen. Pilzinfektionen wurden mittels MRI in Nektarinen, Erdbeeren, Grapefruits, Mandarinen, Orangen und Kokosnüssen untersucht (HILLS und CLARK 2003, ARISTIZÁBAL 2007). Auch konnten beispielsweise Tomatenwurzelgallen, die durch *Meloidogyne incognita* hervorgerufen wurden, im unzerstörten Bodensubstrat nachgewiesen werden (JOHNSON et al. 1986). Die Ausbreitung einer künstlich gesetzten Pilzinfektion mit *Botrytis cinerea* Pers. & Fr. in Himbeerfrüchten verfolgten GOODMAN et al. (1992) mit dieser Methode. Ebenso waren durch *Rhizoctonia solani* ausgelöste Fäulnisprozesse bei Zuckerrüben mit MRI gut detektierbar (HALLOIN et al. 1992).

Durch Weiterentwicklung dieser Technik könnte ein MRI-basierter Krankheitssensor im Mähdrescher zur Erntephase sicher sehr hilfreich sein. Dagegen ist MRI zur Krankheitserkennung während der Ährenentwicklung wohl auch in Zukunft nicht nutzbar.

1.4 Technische Möglichkeiten zur Erkennung von *Fusarium*-Infektionen aufgrund von visuellen Symptomen bzw. physiologischer Parameter

Bei der Erkennung von Krankheitssymptomen eignen sich insbesondere bildanalytische Methoden. So lassen sich Ährenfusariosen einerseits an den damit verbundenen Veränderungen der physiologischen Aktivität befallener Gewebe erkennen. Aber auch die rein visuelle Analyse der Symptome der partiellen Taubährigkeit liefert wertvolle Hinweise. Es gibt verschiedene technische Ansätze, mit denen man beides objektiv messbar machen kann. Vor allem gekoppelt mit Bildanalyse können einige dieser Methoden und Systeme effektive Werkzeuge zur frühzeitigen, automatischen Krankheitserkennung sein. Während durch die Methoden an sich die Eigenschaften der Pflanzen bzw. Bestände erfasst werden, können mit der Bildanalyse räumliche Unterschiede bzw. Zuordnungen erfolgen. So können nicht nur durchschnittliche Aktivitäts- oder spektrale Unterschiede erfasst werden, sondern diese auch den entsprechenden Pflanzen und sogar Pflanzenarealen zugeordnet werden.

Für die genannten Zwecke eignen sich die Thermographie sowie Fluoreszenz- und Spektralmessungen. Bei letzterer unterscheidet man RGB- (Rot-Gün-Blau) sowie

Multispektral- und Hyperspektralaufnahmen im visuellen (VIS: 400-700 nm) und Nahinfrarotbereich (NIR: 700-3000 nm).

1.4.1 Thermographie

Die Thermographie detektiert die Oberflächentemperatur von Objekten im Infrarotbereich (IR) zwischen 8.000-14.000 nm. Alle Körper strahlen Energie in Form von Lichtwellen aus. Thermokameras, bestehend aus CCD-Kamera und Dioden, die meist Quecksilber-Cadmium-Tellurid enthalten, erzeugen Bilder von dieser Strahlung, sogenannte Thermogramme, und können damit gewissermaßen die Wärmestrahlung sichtbar machen (DITTIÉ, 2011a). Die einfachen Thermokameras bilden die aufgenommenen Temperaturen durch Farbunterschiede in einer Grauskala ab. Für eine bessere Kontrastgebung gibt es inzwischen meist Farbthermokameras, die die Temperaturen in Pseudofarben darstellen (JONES 2004).

Bei der Thermographie werden dem Aufnahmebild Temperaturinformationen für jeden Bildpunkt zugeordnet. Die aufgenommenen Daten werden in Pseudofarbenbildern entsprechend den aufgezeichneten Temperaturen dargestellt. Thermokameras können mit einer relativen Genauigkeit von 0,01 K in einer aufaddierten Bildserie arbeiten und erfassen bis zu 100 Bildzeilen in 0,4 Sekunden (DITTIÉ, 2011b). Je nach Einsatzgebiet werden spezielle Kameras gebaut, die sowohl Höchsttemperaturbereiche (+200 °C bis +1200 °C) abdecken als auch im kryogenen Bereich (-120 °C bis -40 °C) einsatzfähig sind.

Es ist von den Energiebilanzaufstellungen bekannt, dass die Blatttemperatur mit der Transpiration der Blätter variiert und daher eine Funktion der stomatären Leitfähigkeit darstellt (JONES 1992). Stress, Krankheiten und Schädigungen führen zu Veränderungen der aktuellen Transpirationsrate, die wiederum sehr gut über Temperaturunterschiede zwischen Umgebung und Blatt mit einer Thermokamera messbar sind. Aufgrund ihrer hohen Sensitivität ist die Thermographie ein frühzeitiger Marker von Schädigungen und wird erfolgreich zur Erkennung von Krankheiten angewandt.

So zeigen Blattschädigungen wie beispielsweise Nekrosen um einige Zehntel Kelvin erhöhte Temperaturen, da durch die gestörte Transpiration die Temperatursenkung an den betreffenden Stellen fehlt. Somit können mithilfe der Thermographiebilder frühzeitig Stellen mit späteren Ausbildungen von Nekrosen erkannt werden. An Tabak- bzw. *Arabidopsis*-Zelltod-Mutanten, die auf Blättern spontan Läsionen bilden, konnten anhand der gemessenen erhöhten Temperaturen ebenfalls die betroffenen Bereiche frühzeitig identifiziert werden (CHAERLE et al. 2001).

Auf unterschiedliche Krankheitserreger reagieren die befallenen Pflanzen mit sehr unterschiedlichen Krankheits- und Temperaturverläufen. Auch das Ausmaß der Temperaturänderung variiert. Bei Untersuchungen von Pepper-Mild-Mottle-Viren an Tabak (CHAERLE et al. 2006) reagierten infizierte, aber asymptomatische Blätter mit Temperaturerhöhung unmittelbar nach Infektion und waren frühzeitig mittels Thermographie detektierbar. HELLEBRAND et al. (2006) fanden in ihren Untersuchungen deutliche Reaktionsunterschiede der Pflanzen bei unterschiedlichen Krankheitserregern. Während Gelbrost-Infektionen (*Puccinia striiformis* West.) bei Weizenpflanzen kaum Temperaturveränderungen anzeigten, reagierten mehltaubefallene Sprösslinge (*Blumeria graminis* DC. f. sp. *tritici* March.) mit einer deutlichen Temperaturabsenkung des Bestandes von 0,2 bis 0,9 K gegenüber den gesunden Kontrollen. Im Gegensatz zu den Untersuchungen von HELLEBRAND et al. (2006) zeigte ein anderer Weizenbestand bei

Infektionen mit *Puccinia striiformis* West. deutliche Temperaturveränderungen, die zudem vom Infektionsstadium abhängen (SMITH et al. 1986). Dort verursachte die Erkrankung in einem frühen Infektionsstadium erst eine Temperatursenkung um 0,2 bis 1 °C gegenüber gesunden Blättern, im weiteren Infektionsgeschehen jedoch erhöhte sich wiederum die Blatttemperatur (SMITH et al. 1986).

Einige Krankheiten verursachten Temperaturänderungen von bis zu 4 °C, z. B. Pilze wie *Fusarium solani*, *Pythium ultimum* und *Rhizoctonia solani* bei Bohnen (TU und TAN 1985) sowie *Pseudoperonospora cubensis* an Gurken (LINDENTHAL 2005, OERKE et al. 2006). Bei anderen Krankheiten waren gar keine Temperaturänderungen feststellbar (DUSZEK 1987). In der Arbeit von DUSZEK (1987) konnten bei der Fußkrankung mit *Fusarium culmorum* an Weizenjungpflanzen keine signifikanten Temperaturunterschiede gemessen werden. Dazu ist aber anzumerken, dass die Temperaturmessungen unter kontrollierten Bedingungen sehr gute Ergebnisse zeigen, unter Feldbedingungen jedoch (wie bei DUSZEK 1987) dieser Methode Grenzen gesetzt sind, weil sie ebenso sensibel auf störenden Umwelteinflüsse reagiert. So treten bei nicht konstantem Wasserangebot im Boden (SCHMITZ 2004) bzw. variierenden Faktoren wie Wasserversorgung der Pflanzen, deren Blattalter und unterschiedliche Befallsgrade (LINDENTHAL 2005) Probleme bei der objektiven Befallseinschätzung auf. Das Hauptproblem der Thermographie ist, pathologische Effekte bei der Wasserverlustrate von denen zu unterscheiden, die durch trockenheitsinduzierten Stomatasschluss herrühren. Ein weiteres Handicap im Feld ist die Verfälschung der Messungen durch Windeinfluss (JONES 2004).

Dennoch besitzt die Methode auch in der Fernerkundung Potential (NILSSON 1995, PINTER et al. 1979, STENZEL et al. 2007). Einige Autoren verweisen aber auf die Schwachpunkte bei alleiniger Verwendung zur Krankheitserkennung und sehen die Zukunft einer genaueren Krankheitsdetektion eher in einer Kombination der Thermographie mit anderen Methoden. So schlagen CHAERLE und VAN DER STRAETEN (2001) und NILSSON (1995) zusätzliche Messungen zur Gewinnung spektraler Informationen vor. CHAERLE et al. (2003, 2004) erhöhten die Aussagekraft der thermischen Bilder durch eine Kombination mit der Chlorophyllfluoreszenz oder mit Videoaufnahmen.

Auch eine zusätzliche Belichtung der aufzunehmenden Feldbestände könnte helfen, zumindest durch die Licht-Schattenwirkungen auftretenden Temperaturunterschiede zu kompensieren (BRAVO 2006, NICOLAS 2005). Eine alternative Methodenspezifizierung, die aktive Thermographie, nutzt eine externe Energiequelle (optisch, elektromagnetisch, mechanisch) um die Oberfläche des Untersuchungsobjektes einheitlich zu erwärmen. Anhand der Thermobilder können defekte und intakte Stellen erkannt werden (IBARRA-CASTANEDO et al. 2009). In der Qualitätssicherung fand diese spezifizierte Aufnahmemethode Anwendung (BARANOWSKI et al. 2009).

1.4.2 Chlorophyllfluoreszenz

1.4.2.1 Prinzipien der Chlorophyllfluoreszenz-Messung

Als Fluoreszenz wird die kurzzeitige spontane Emission von Licht beim Übergang eines elektronisch angeregten Systems in einen Zustand niedrigerer Energie bezeichnet, wobei das abgegebene Licht im Regelfall energieärmer ist als das vorher absorbierte (VON WILLERT et al. 1995). Wird einem Molekül energiereiche Strahlung zugeführt, werden Elektronen aus ihren Orbitalen herausgelöst und in unbesetzte Orbitale mit höherem Energiegehalt gehoben. Dieser angeregte Zustand ist allerdings ungünstig und instabil. Bereits nach Bruchteilen von Sekunden fällt das Elektron wieder in sein ursprüngliches

Orbital zurück, wobei die Energie als elektromagnetische Strahlung, als Fluoreszenzlicht, abgegeben wird (WEIß 2011). Durch den Energieverlust ist die Abgabe (Emission) von Fluoreszenzlicht daher meist langwelliger, energieärmer als das eingestrahlte Anregungslicht (Excitation). Der Anteil der Nettofluoreszenz beträgt bei gesunden Pflanzen nur 3-6% (DENFFER et al. 1983). Die Pflanze ist bestrebt, möglichst viel der Lichtenergie einzufangen und der Energiegewinnung mithilfe der Photosynthese zuzuführen. Sie nutzt dazu auch, neben den Chlorophyllen, die sogenannten akzessorischen Pigmente (Carotinoide). Die Pigmente sind an Proteine gekoppelt und so angeordnet, dass möglichst viel des breiten Sonnenlichtspektrums eingefangen (390-710 nm, LICHTENTHALER 1994) und photosynthetisch genutzt werden kann. Die Energie wird von Pigment zu Pigment weitergeleitet, um letztendlich in den Reaktionszentren des Photosystems II dafür eingesetzt zu werden, dem Wasser Elektronen zu entziehen.

Bei der Messung von pflanzlichem und tierischem Material gibt es verschiedene Arten der Fluoreszenzanalyse. Dabei lassen sich prinzipiell drei mögliche Messprinzipien unterscheiden. So kann man entweder das gesamte Fluoreszenzemissionsspektrum aufnehmen (Fluoreszenzspektroskopie), die Amplitude des Fluoreszenzsignals registrieren (Fluoreszenzintensität) oder die zeitliche Veränderung der Fluoreszenzsignale (Fluoreszenzkinetik) messen (Abb. 2).

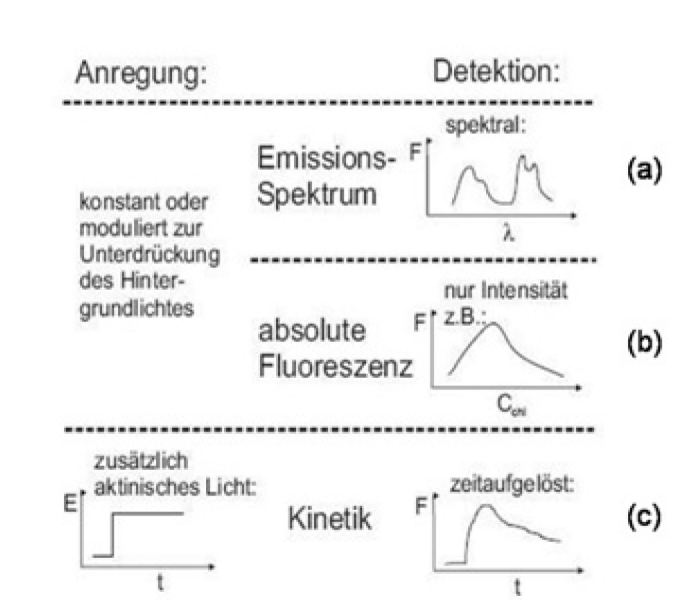


Abbildung 2: Überblick über drei mögliche Fluoreszenzmessprinzipien bei grünem Pflanzenmaterial. Es wird (a) das gesamte Fluoreszenzspektrum über einen festgelegten Wellenlängenbereich erfasst, (b) die Intensität der Fluoreszenz bei einer Wellenlänge oder einem engen Wellenlängenbereich gemessen in Abhängigkeit des Fluoreszenzsignales von der Chlorophyllkonzentration C_{chl} oder (c) die zeitliche Veränderung des Fluoreszenzsignals analysiert, wobei aktinisches Licht (E) den physiologischen Zustand des Blattes über die Zeit (t) verändert (verändert nach THIESSEN 2002).

Beim Messen des Emissionsspektrums wird nach Anregung eines Objektes das zurückgestrahlte Fluoreszenzlicht aufgenommen. Bandpassfilter ermöglichen die Messungen in einem nur schmalen Wellenlängenbereich. Verschiedene Zellkomponenten können anhand des Emissionsspektrums erfasst werden (LICHTENTHALER 1994). So

emittieren Zellwände, die viel Lignin enthalten, in einem kurzwelligeren Wellenlängenbereich. Auch die in den Zellwänden eingebauten Phenole (z. B. Hydroxy-Zimtsäure und Flavonole), die bei Infektionsabwehr eine wichtige Rolle spielen, werden in einem kurzwelligeren, blauen Bereich von 450 nm erfasst (STOBER et al. 1994).

Im Gegensatz dazu ist die Chlorophyllverteilung ein hilfreicher Indikator, um Reaktionen auf unterschiedliche Stressfaktoren zu erkennen (NILSSON 1995). Beispielsweise dient das Verhältnis der Fluoreszenzsignale bei den Wellenlängen ca. 690 nm und 735 nm als Stressindikator des Photosyntheseapparates und können zur zerstörungsfreien Chlorophyllgehaltsbestimmung genutzt werden (LICHTENTHALER 1988, TARTACHNYK und RADEMACHER 2003).

Bei dem dritten Ansatz wird die ganz charakteristische Kinetik des Chlorophyllfluoreszenzsignals nach Wiederbelichten des vorverdunkelten Produktes analysiert. Das Bestrahlen mit photosynthetisch wirksamem aktinischen Licht, führt zu einer charakteristischen Fluoreszenzänderung, der Fluoreszenzinduktion (Abb. 3). Dieser sogenannte Kautskyeffekt (VON WILLERT et al. 1995) tritt nur bei intakten, photosynthetisch aktiven Pflanzen auf, nicht aber bei chlorophyllhaltigen, aber toten Geweben (z. B. Heu). Auch die Änderung des Fluoreszenzsignales selbst ist stark von der Intaktheit des Photosyntheseapparates bzw. von der Funktionsfähigkeit des gesamten Photosyntheseprozesses abhängig (MAXWELL und JOHNSON 2000).

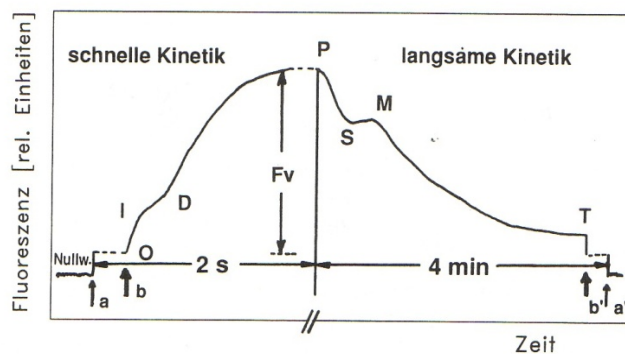


Abbildung 3: Fluoreszenzinduktionskurve, sogenannter Kautsky-Effekt: a und a': An- bzw. Ausschalten des Messlichtes; b und b': An- bzw. Ausschalten des aktinischen Lichtes; O: Grundwert F_0 ; I: erstes Maximum F_I ; D: Anstieg im Schulter-Bereich; P: Spitzenwert (Peak), bei Gabe eines sättigenden Lichtimpulses entspricht P auch M, der maximalen Fluoreszenz, T: Endwert, Abfall der Fluoreszenz auf einen relativ konstanten Endwert (T von terminal = Endstadium) (VON WILLERT et al. 1995).

1.4.2.2 Messung der Chlorophyllfluoreszenzkinetik

Grundlagen der CFA-Messungen

Lichtenergie wird primär von den Chlorophyllmolekülen absorbiert. Sie kann genutzt werden, um (1) die Photosynthese anzutreiben (Photochemie), (2) überschüssige Energie kann als Wärme abgegeben werden oder sie kann (3) als

Chlorophyllfluoreszenzlicht ausgestrahlt werden. Diese drei Prozesse stehen im Wettbewerb, so dass die Erhöhung eines Bereiches zur Verringerung des anderen führt. Die Messung der Chlorophyllfluoreszenz kann somit wichtige Informationen über die Veränderungen in der Effizienz der Photochemie und Wärmedissipation liefern (MAXWELL und JOHNSON 2000).

Photochemische Prozesse können somit zur Abnahme des Fluoreszenzsignales führen, sozusagen die Fluoreszenz „löschen“. Der Anteil dieses Geschehens wird in der Literatur als „photochemical quenching“ beschrieben und als photochemischer Löschungskoeffizient q_P dargestellt.

Die anderen Faktoren bzw. Prozesse (Nummerierung 2-3) werden als nichtphotochemische Fluoreszenzlöschung bezeichnet bzw. mit dem nichtphotochemischen Fluoreszenzlöschungskoeffizienten q_N erfasst. Dieses nichtphotochemische Quenching setzt sich aus drei Einflussgrößen zusammen. So wird bei der energieabhängigen Fluoreszenzlöschung q_E der Energieabbau (v. a. Abbau des Protonengradienten) durch ein Umschalten von Fluoreszenz auf Wärmeabstrahlung bewirkt. Einen weiteren, aber geringen Anteil, macht der Energietransfer (q_T) aus, der durch unterschiedliche Photoneneinfangsquerschnitte der Photosysteme I und II bewirkt wird (VON WILLERT et al. 1995). Die dritte, sehr komplexe photoinhibitorische Komponente (q_I) ist vor allem bei Bestrahlung der Pflanzen mit Starklicht wichtig. Als Schutzmechanismen werden die Antennen des Photosystems II im sogenannten Xanthophyll-Zyklus (DEMMIG-ADAMS et al. 1996) durch eine reversible Zeaxanthin-Anhäufung (auf Kosten von Antheraxanthin) partiell deaktiviert. Außerdem kann die Energienutzung durch Inaktivierung der Reaktionszentren P_{680} sowie durch verstärkte Schädigung und verzögerte Reparatur (damage-repair Mechanismus; OSMOND 1994) des Photosystem-II-Kernkomplexproteins (D1) erniedrigt werden. Dennoch kann Starklicht bei Überlastung der Schutzmechanismen zu irreversiblen Schädigungen der Photosynthesekomplexe führen.

Aus dem Zusammenspiel der eingangs beschriebenen drei Formen der Lichtenergienutzung ergibt sich, dass die Fluoreszenzausbeute hoch ist, wenn die Photochemie und die Wärmeabgabe gering sind.

Umgekehrt resultiert ein Anstieg der Photochemie und/oder der Wärmeabgabe in einer teilweisen Löschung (quenching) des Fluoreszenzsignals. Die relativen Anteile von photochemischem (q_P) bzw. nichtphotochemischem Quenching (q_N) lassen sich mit der sogenannten Sättigungspulsmethode (SCHREIBER et al. 1986) ermitteln. Dabei wird durch einen kurzen (ca. 1 s), intensiven Lichtpuls die primären Elektronenakzeptoren von PS II (Q_A) vollständig reduziert. Damit wird der photosynthetische Elektronentransport und somit die Umwandlung von Lichtenergie in photochemische Energie verhindert ($q_P = 0$).

Bei dunkeladaptierten Pflanzen ist die Möglichkeit zur nichtstrahlenden Energiedissipation als Wärme nicht gegeben, da die entsprechenden (Schutz-) Mechanismen inaktiv sind (VON WILLERT et al. 1995). Ebenso ist die photochemische Energienutzung nicht möglich. Die Verdunklung bewirkt, dass die Komponenten des PS I, PS II und der Elektronentransportkette oxidiert vorliegen (SCHREIBER 2004). Entsprechend der drei konkurrierenden Komponenten wird die überschüssige Energie als Fluoreszenz abgegeben.

Werden dunkeladaptierte Pflanzen durch ein Licht mit sehr niedriger Photonenflussdichte ($<1 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) bestrahlt, werden die Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben und das PS II gelangt in einen angeregten Zustand, der Grundfluoreszenz F_0

(Abb. 4). Hierbei sind die primären Akzeptoren innerhalb des PS II (Q_A) noch oxidiert, d. h. q_N ist Null und q_P hat den Maximalwert, also 1.

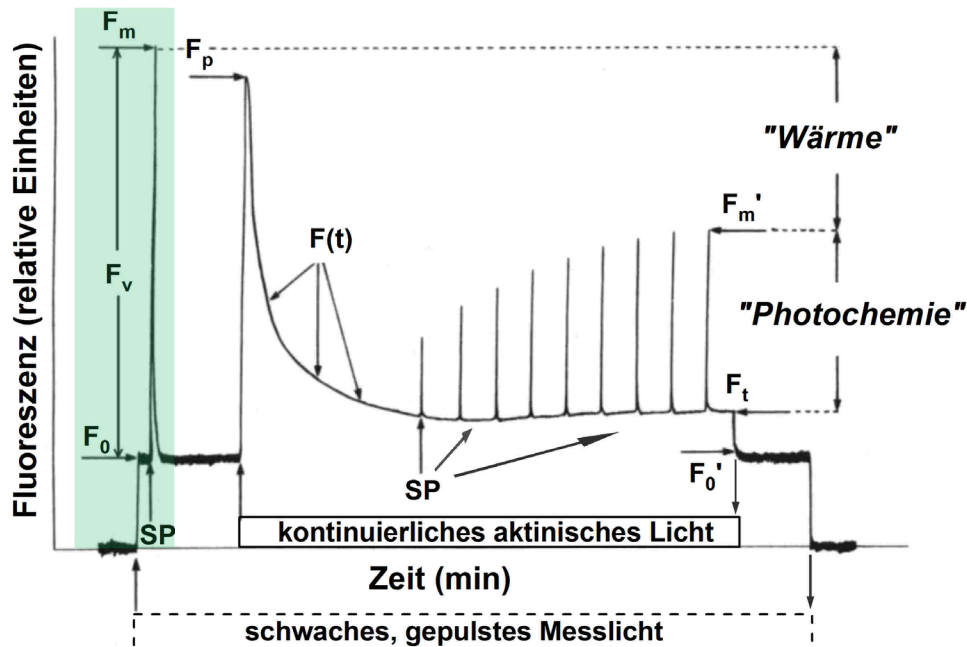


Abbildung 4: Typischer Chlorophyllfluoreszenz-Signalverlauf bei Verwendung der Sättigungspulsmethode (SP = Sättigungslightimpuls) (HERPPICH 2001). Der grün unterlegte Bereich hebt die tatsächlich gemessenen und ausgewerteten Parameter hervor.

Sobald mit einem kurzen Sättigungspuls aktinisches Licht auf das Objekt trifft, werden alle Reaktionszentren des Photosystems II geschlossen. Die photochemischen Vorgänge der CO_2 -Reduktion sind noch nicht angelaufen. Damit erlangt q_P den Wert 0. Da q_N aufgrund der Kürze der Lichtgabe nicht aktiviert werden kann, wird die aufgenommene Energie entsprechend der drei konkurrierenden Komponenten ausschließlich als Fluoreszenz abgegeben. Das Fluoreszenzsignal steigt auf einen maximalen Wert F_m an. Im Gegensatz zur beobachteten Grundfluoreszenz F_0 ist F_m charakterisiert durch reduzierte PS II-Reaktionszentren.

Nach dem kurzen Lichtsättigungspuls nimmt die Fluoreszenz ab. In diesem Stadium werden wieder alle PS II-Reaktionszentren oxidiert. Bei Gabe von aktinischem Licht beginnt die CO_2 -Fixierung innerhalb des Photosyntheseprozesses. Weiterhin werden die mit dem Begriff q_N zusammengefassten photoprotektiven Mechanismen in Gang gesetzt. Der folgende Fluoreszenzpeak F_m' ist demzufolge niedriger als F_m . Nach der letzten Lichtbestrahlung mit aktinischem Licht vergehen einige Minuten bis ein mehr oder weniger stabiler Zustand/Endwert erreicht wird (F_t).

Durch die Aufnahme dieser einzelnen Parameter ermöglicht es die Chlorophyllfluoreszenzanalyse, die potentielle und momentane Leistungsfähigkeit der Photosynthese sowie die Intaktheit des Photosyntheseapparates einzuschätzen. Auch Aussagen zur relativen Aktivität verschiedener physiologischer Schutzmechanismen und

dem Ausmaß des photosynthetischen Elektronentransportes lassen sich treffen (HERPPICH 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde in Hinblick auf die anvisierte spätere Feldtauglichkeit die schnelle Kinetik aufgenommen, d. h. die Parameter F_0 , F_v und F_m nach dem ersten Sättigungsimpuls erfasst (Abb. 4 grün unterlegt).

Zwei Messprinzipien

Eine Lichtquelle im roten Wellenlängenbereich dient zur Anregung der Chlorophyllfluoreszenz und eine Lichtquelle mit photosynthetisch wirksamem (aktinischen) Licht setzt die Fluoreszenzinduktion in Gang. Dabei werden das gegebene Anregungslicht und das zu detektierende Fluoreszenzlicht getrennt weitergeleitet.

Prinzipiell kann mit zwei Prinzipien der Lichteinwirkung gemessen werden: einer kontinuierlichen und einer pulsmodulierten Lichteinstrahlung.

Bei der kontinuierlichen Lichteinstrahlung auf das Objekt wird sowohl das fluoreszenzanregende als auch das aktinisch wirksame Licht kontinuierlich auf das Objekt eingestrahlt, wobei ein Kurzpassfilter den langwelligen Anteil des Lichtspektrums der verwendeten Halogenlampe wegnimmt. Über ein zweites Glasfaserkabel wird das emittierte (zurückgestrahlte) Fluoreszenzlicht auf einen Detektor geleitet. Ein Langpassfilter verhindert, dass reflektiertes aktisches Licht dieses Fluoreszenzlicht verfälscht. Die erforderliche Verdunklung im Vorfeld der Fluoreszenzinduktionsmessungen wird mit speziellen Verdunklungsküvetten erreicht. Beispielsweise nutzt der Plant Efficiency Analyser (Hansatech Instruments Ltd., King's Lynn, England) dieses Messprinzip.

Bei den pulsmodulierten Fluoreszenzmessgeräten (Fluorometern) kann das Messlicht von der gegebenen aktinischen Strahlung getrennt werden. Zunächst wird die Fluoreszenz durch kurze, nur Mikrosekunden dauernde Lichtpulse ausgelöst. Das Anregungslicht hierfür liegt im roten Wellenlängenbereich, z. B. 620 nm (FluorCam, PSI, Brno, Tschechische Republik) bzw. 655 nm (PAM, Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Deutschland) und wird meist durch Leuchtdioden (= LEDs = lichtemittierende Dioden) erzeugt. Ein Kurzpassfilter dient der Begrenzung des Anregungslichtes auf einen engen Wellenlängenbereich. Die ausgelösten Fluoreszenzsignale werden über einen Langpassfilter, der das kurzwellige Streulicht eliminiert, in einen Glasfaserlichtleiter weitergeleitet und mit einer Photodiode detektiert. Ein Ausschnittsverstärker ermöglicht eine selektive Endverstärkung der Fluoreszenzmesssignale und ist vom selben Taktgeber wie die LEDs gesteuert. Damit ist eine Trennung der Messsignale von störenden, überlagernden Lichtsignalen möglich. Dies stellte einen riesigen Vorteil gegenüber der Fluoreszenzmessung mit kontinuierlicher Lichteinstrahlung dar und revolutionierte die Anwendbarkeit der Methode (MAXWELL und JOHNSON 2000). Mit der pulsmodulierten Lichteinstrahlung kann nunmehr in Anwesenheit der Hintergrundbeleuchtung und vor allem bei Sonnenlicht im Feld gemessen werden.

1.4.2.3 Chlorophyllfluoreszenzanalyse (CFA) zur Erkennung physiologischer Veränderungen bei Umweltstress

Die Chlorophyllfluoreszenzanalyse stellt umfangreiche Informationen über die potentielle und aktuelle Aktivität der Photosynthese bereit (MAXWELL und JOHNSON 2000, VON

WILLERT et al. 1995), welche oft beträchtlich in gestressten oder infizierten Pflanzen reduziert ist (BAKER und ROSENQVIST 2004).

Laufen photosynthetische Prozesse ungestört ab, wird die absorbierte Lichtenergie fast ausschließlich in biochemische Energie (ATP, NADPH/H⁺) umgewandelt und nur ein sehr geringer Teil als Fluoreszenz und Wärme ausgestrahlt. In Stresssituationen sind die normal ablaufenden biochemischen Prozesse gestört, es kann ein größerer Teil der Energie als Fluoreszenz in die Umgebung abgegeben werden (LICHTENTHALER 1994) oder aber auch der Anteil des nichtphotochemischen Quenchings ansteigen.

So führt Hitzestress zur Schädigung der Reaktionszentren des PS II und erhöht die Grundfluoreszenz (F_0) (VON WILLERT et al. 1995). Andere Stresssituationen wie Kälte, Frost, Trockenheit, Sauerstoffmangel, Pathogeninfektionen und Herbizideinsatz können ebenfalls zu einer gestörten photochemischen Energienutzung führen. Der so hervorgerufene Energieüberschuss oder „Rückstau“ (HERPPICH 2001) induziert eine Serie von Schutzmechanismen, die als erhöhte Wärme- und Fluoreszenzabgabe messbar sind. Damit ist die Höhe der Fluoreszenzparameter F_0 und F_m und dem daraus abgeleiteten Quotienten F_v/F_m ($F_v = F_m - F_0$) ein guter Indikator für die Intaktheit bzw. Störung der Photosynthese.

Nach KITAJIMA und BUTLER (1975) steht F_v/F_m in einem engen Verhältnis zum Quantenertrag der Photochemie des PS II. F_v/F_m ist als Maß für die Effizienz anzusehen (BAKER 1991), mit der die Anregungsenergie aus den Antennenkomplexen von den offenen Reaktionszentren in PS II übernommen wird und ist ein Indikator für die Intaktheit des Photosynthesesystems. Bei der Interpretation von F_v/F_m muss man sich im Klaren darüber sein, dass ein niedriger F_v/F_m -Wert einerseits durch einen Anstieg von F_0 von einer Schädigung in den PS II-Reaktionszentren herrühren kann. Andererseits kann aber auch F_v durch eine Erhöhung der nicht strahlenden Energiedissipation abfallen. Beide Fälle führen zu einem Abfall von F_v/F_m .

1.4.2.4 CFA als Methode zur Krankheitserkennung

Die Messung und Analyse von äußerlich nicht sichtbaren, gestörten Photosyntheseprozessen mittels Chlorophyllfluoreszenzanalyse ermöglichen es, frühzeitig Erkrankungen zu erkennen, ohne dass bzw. bevor visuell sichtbare Krankheitssymptome auftreten. So konnte eine symptomfreie Infektion von Bananenblättern durch den endophytischen Pilz *Colletotrichum musae*, der in einem frühen Stadium die photosynthetische Aktivität der Blätter beeinträchtigt, anhand verringerter F_v/F_m -Werte erkannt werden (PINTO et al. 2000). Im Vergleich zu endophytenfreien ungestressten Kontrollpflanzen zeigten 45 Tage alte infizierte Pflanzen um ca. 15% verringerte F_v/F_m -Werte.

In der gleichen Studie wiesen mit *Fusarium moniliforme* infizierte Maispflanzen dagegen ähnliche F_v/F_m -Werte wie die Kontrollen auf. Dies ist ein Hinweis, dass die photosynthetische Aktivität in diesem Fall nicht durch die *Fusarium moniliforme*-Infektion beeinflusst wurde.

In anderen Untersuchungen wird immer wieder die zeitige Erkennung von Erkrankungen hervorgehoben. Obwohl noch keinerlei Symptome an den Blättern erkennbar waren, konnten verringerte F_v/F_m -Werte bei mit *Fusarium lycopersici* und *Verticillium albo-atrum* infizierten Tomaten zu allen drei Messterminen (7 dai, 14 dai und 21 dai) festgestellt werden (LORENZINI et al. 1997). D.h. mindestens eine Woche vor visuellen Symptomen

wurde die Erkrankung mit der CFA erkannt. So erniedrigte sich bei *Fusarium lycopersici* die variable Fluoreszenz, während die Grundfluoreszenz ähnlich der der Kontrollen blieb. D.h. die maximale Fluoreszenz ging zurück. Bei *Verticillium albo-atrum* wiederum erhöhten sich unmittelbar nach Infektion (7 dai) sowohl die Grund- als auch variable Fluoreszenz, am 14. dai kam es zu einer leichten Erhöhung von F_v/F_m , während diese dann im Krankheitsverlauf wieder sank. Diese Arbeit ist ein Beispiel dafür, dass zwei unterschiedliche Erreger unterschiedliche Reaktionen bei den Tomatenblättern im Umgang mit der Erkrankung zeigten.

Andere Arbeiten untersuchen v. a. den Krankheitsverlauf und die -ausbreitung. An mit *Puccinia coronata* infizierten Haferblättern wurden unterschiedliche Erkrankungsbezirke festgestellt (SCHOLLES und ROLFE 1996). Fünf Tage nach der Inokulation war an den erkrankten, gelb verfärbten Stellen des Blattes ein verringerter Φ_{II} -Wert, während die nicht infizierten Blattbereiche ähnliche Werte wie die Kontrollen aufwiesen. Dagegen war der Wert der nichtphotochemischen Energiedissipation ($\Delta F_m/F_m'$) über das ganze Blatt stark vermindert – im Gegensatz zu den gesunden Kontrollen. Acht Tage nach Inokulation war Φ_{II} über das gesamte infizierte Blatt erniedrigt, an den mycelbesetzten Stellen aber besonders ausgeprägt. Zum Ende der Messreihe (11 dai) gab es sogenannte grüne Inseln, die sehr niedrige Φ_{II} -Werte, aber erhöhte $\Delta F_m/F_m'$ -Werte zeigten, ein Hinweis, dass diese Gewebezellen zwar stark geschädigt, aber noch nicht tot waren.

Die Breite der Anwendungsmöglichkeiten ist riesig, einige Beispiele der unterschiedlichen Aspekte sind in Tab. 2 zusammengestellt.

Tabelle 2: Anwendungsmöglichkeiten der CFA, hauptsächlich mittels F_v/F_m -Wert

Stressreaktionen und Nährstoffmangel bei Pflanzen	HERPPICH et al. 2001, TARTACHNYK und RADEMACHER 2003
Qualitätsbestimmung von Früchten und Gemüse	FOERSTER et al. 2009, HERPPICH 2002, HERPPICH et al. 2009, LINKE et al. 2005, SCHLÜTER et al. 2008a, SCHLÜTER et al. 2008b
Vitalität- und Qualitätsminderung bei Lagerung von Früchten als Folge von Krankheit (<i>Penicillium digitatum</i> bei <i>Citrus limon</i>)	NEDBAL et al. 2000a
Schädigungen des Pflanzengewebes durch Insektenbefall	FORSTREUTER et al. 2006
Frost	NEUNER und BUCHNER 1999
Pilze <i>Chrysomyxa rhododendri</i> an Nadelbäumen <i>Puccinia recondita</i> und <i>Blumeria graminis</i> an Winterweizen <i>Puccinia coronata</i> an Hafer	BAUER et al. 2000 KUCKENBERG et al. 2007 NOGUES et al. 2002

<i>Fusarium oxysporum</i> an Tomate	SCHOLES und ROLFE 1996
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> und <i>Verticillium albo-atrum</i> an Tomate	LORENZINI et al. 1997
<i>Puccinia striiformis</i> West. an Getreide	HERPPICH et al. 2005
<i>Cercospora beticola</i> an Zuckerrübe	CHAEERLE et al. 2007a
<i>Plasmopara viticola</i> an Weinblättern	CSÉFALVAY et al. 2009
Virenbefall	
tobacco mosaic virus	BALACHANDRAN et al. 1994, DALEY 1995
soybean mosaic virus	ALDEA et al. 2006
pepper mild mottle virus	CHAEERLE et al. 2006, PINEDA et al. 2008
tulip breaking virus	POLDER et al. 2010

Mit der CFA können Objekte unterschiedlicher Skalen aufgenommen werden: von ganzen Pflanzen über Pflanzenteile bis in die zellulären Ebenen (BAKER et al. 2001, ROLFE und SCHOLES 2010). Sie hat den Vorteil, lebende Objekte in Zeitreihen aufzunehmen, was essentiell für Krankheitsausbreitungen ist. Aber auch Pflanzenteile wie abgetrennte Blätter und Blattsegmente sind für ein Resistenzscreening gegenüber Krankheiten geeignet (CHAEERLE et al. 2007a, PROKOPOVÁ et al. 2010).

1.4.2.5 Vorteile der Chlorophyllfluoreszenzbildanalyse

Für einige Fragestellungen reichen gemittelte Photoeffizienzwerte bei der Chlorophyllfluoreszenzmessung. Geräte wie das PAM 2000 (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Deutschland) liefern gemittelte Werte von einem Messpunkt. Damit sind Aussagen über die verminderte Photosyntheseeffizienz an bestimmten Stellen des Blattes bzw. der Pflanze möglich (BILGER et al. 1995), die aber vorher genau definiert werden müssen, weil die Messergebnisse nicht mit einer Bildauswertung gekoppelt sind.

Wie das in der vorliegenden Arbeit genutzte Fluoreszenzmesssystem FluorCAM 700MF (Photon Systems Instruments-PSI, Brno, Tschechische Republik) besitzen Geräte wie das „M-Series IMAGING-PAM“ (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Deutschland), das MIPS-System (Multiple Imaging Plant Stress; Plant Dynamics BV, Wageningen, Niederlande) oder der CF Imager (Technologica Ltd., Colchester, UK) die Vorteile der Bildanalyse. Durch die damit verbundene räumliche Zuordnung der Fluoreszenzparameter bzw. der Photosyntheseigenschaften sind die für einige Krankheiten charakteristischen Schädigungsmuster erkennbar und eine (Früh-) Erkennung des Befalls wird erleichtert. So sind kreisförmige, abgestorbene Pusteln mit einem kreisrunden mitbetroffenen Infektionsradius bei *Cercospora beticola*-Infektionen bei der Zuckerrübe (Rüben-*Cercospora*-Blattfleckenkrankheit) besonders im Anfangsstadium (CHAEERLE et al. 2006) genauso typisch wie das Muster der teilweise abgestorbenen Ährchen neben noch völlig intakten bei der Partiellen Taubährrigkeit (BAURIEGEL et al. 2010).

Mit einem Imaging-PAM-Chlorophyllfluorometer konnten an infizierten Blättern einer gegenüber *Puccinia triticina* anfälligen und einer hochtoleranten Weizensorte in einer Zeitreihe Fluoreszenzbilder aufgenommen werden (BÜRLING et al. 2010). Bestimmte Areale (regions of interests) wurden zur Analyse des Parameters Y(NO) ausgewählt.

Y(NO) beschreibt nach KRAMER et al. (2004) den Ertrag der nichtregulierten Energiedissipation im Photosystem II. Bereits zwei Tage nach Inokulation konnten unterschiedliche Infektionsantworten mittels Y(NO) zur Detektion von anfälligen Sorten gewonnen werden, wohingegen erst 6 Tage nach Inokulation erste kleine rot-braune Pusteln erschienen und visuell bonitiert werden konnten. Infektionen mit Blattrost und Mehltau bei Weizen wurden durch einen Rückgang der photochemischen Effizienzwerte F_v/F_m bzw. F_v/F_0 zwei bis drei Tage vor dem Sichtbarwerden von Symptomen durch die Bildauswertung der Chlorophyllfluoreszenzaufnahmen erkannt (KUCKENBERG et al. 2007).

CHAEERLE et al. (2007b) nutzten die Chlorophyllfluoreszenzbildanalyse zur Erkennung von Pilz-Pflanze-Interaktionen bei *Cercospora beticola* und der Zuckerrübe als Wirtspflanze und fanden deutliche Sortenunterschiede in der Anfälligkeit für die Blattfleckenkrankheit bei Zuckerrübe.

Praktischen und wirtschaftlichen Nutzen bietet die Chlorophyllfluoreszenzbildanalyse bei der Anwendung in der Züchtung (CSÉFALVAY et al. 2009). Die CFA wird von diesen Autoren als ein erfolversprechendes Instrumentarium beispielsweise für eine rasche Resistenzselektion gegenüber Falschem Mehltau (*Plasmopara viticola*) bei Weinreben (*Vitis vinifera* L.) eingeschätzt.

Durch die kommerzielle Verbreitung benutzerfreundlicher Messgeräte in den letzten Jahren verwendet inzwischen eine breite Nutzergemeinschaft die Chlorophyllfluoreszenzbildanalyse, auch vorrangig zur Krankheitsdetektion. Die Vorteile einer nicht-invasiven, sensitiven und schnellen Aufnahmemethode sind hilfreich und für viele Fragestellungen zwingend erforderlich. Darüber hinaus wird dieser Methode ein großes Potential bei Kombination mit anderen nichtinvasiven Techniken wie Thermographie und Gaswechsellmessungen zugeschrieben (ROLFE und SCHOLLES 2010).

1.4.3 Reflexionsbasierte Aufnahmemethoden

Die spektrale Reflexionsmessung im sichtbaren und Nahinfrarotbereich (400-3000 nm) hat sich als sensitive Methode in Landwirtschaft, Gartenbau und Fernerkundung (LENK et al. 2007, NILSSON 1995, SCOTFORD und MILLER 2005) etabliert.

Spektrale Messungen helfen, Veränderungen im chemischen Aufbau, der Zusammensetzung bzw. der Anteile bestimmter Stoffe nicht-invasiv darzustellen (BENITO et al. 2008, MERZLYAK et al. 2005, SOLOVCHENKO et al. 2005). Ebenso werden sie vielfach zur Qualitätsbestimmung landwirtschaftlich-gärtnerischer Produkte eingesetzt (ARIANA et al. 2006, KIM et al. 2001, POLDER et al. 2002, QUILTZSCH und HOBERG 2003, QUILTZSCH et al. 2005).

Die spektralen Aufnahmen werden unter anderem zur Bestandskontrolle, bei der Unkrautererkennung (LAMB und WEEDON 1998, LAMB et al. 1999; BROWN und STECKLER 1993) und –bekämpfung (HAGGAR et al. 1983), bei der Kontrolle bzw. Einschätzung der Nährstoffversorgung im Bestand (BÖHRNSEN 2004, FRITZGERALD et al. 2010, FRITZMEIER 2008) und vor allem im Pflanzenschutz eingesetzt (FRANKE und MENZ 2007, LORENZEN und JENSEN 1989, WEST et al. 2003).

Um Pflanzenschutzmaßnahmen rechtzeitig und zielorientiert durchzuführen und Pflanzenschutzmittel aus Umwelt- und Kostengründen niedrigdosiert einzusetzen, ist eine frühzeitige und genaue Erkennung der Erkrankung bzw. des Schadbildes erforderlich. Die meisten Erkrankungen führen zu veränderten äußeren Erscheinungsbildern der Ähren

bzw. Pflanzen. Die vorzeitigen Seneszenzprozesse erkrankter Blätter oder Ähren, wie etwa der Chlorophyllabbau, spiegeln sich in veränderten spektralen Eigenschaften wider.

Deshalb bietet die spektrale Bildanalyse eine aussichtsreiche Möglichkeit, diese äußerlich sichtbaren Veränderungen zu detektieren. Auch zur Erkennung der Partiellen Taubährigkeit ist sie von Vorteil, da sie effektiv und nicht-invasiv anzuwenden ist. Zusätzliche Arbeitsschritte wie eine Probenentnahme, -aufbereitung und -analyse im Labor sind nicht erforderlich.

Abhängig von der Fragestellung und dem Anwendungsbereich können bei der spektralen (Bild-)analyse unterschiedliche Messbereichsmöglichkeiten ausgeschöpft werden. Bei monospektralen Bildaufnahmesystemen sind jedem aufgenommenen Bildpunkt bestimmte Intensitätswerte oder Intensitätsdifferenzen zugeordnet (Thermokamera, sw-Kamera, Fluoreszenzkamera). Bei digitalen Farbkameras wird jeder Bildpixel mit Informationen der Kanäle Rot, Grün und Blau (RGB-Kameras) belegt. Multispektralkameras benutzen mehr als drei definiert gefilterte Wellenlängenbereiche. Von Hyperspektralkameras spricht man, wenn jedem Pixel ein ganzes Wellenlängenspektrum (und jeder Wellenlänge eine bestimmte Intensität) zugeordnet werden kann.

1.4.3.1 RGB-Aufnahmen

Grauwertbilder zeigen die Lichtintensität über einen Teil des elektromagnetischen Spektrums in einem einzigen Band bzw. Kanal. Farbbilder, wie sie auch mit den heute gebräuchlichen Digitalkameras aufgenommen werden, reflektieren die aufgenommene Lichtintensität über die Farbanteile Rot, Grün und Blau des Spektrums (POLDER et al. 2002). Dabei werden entsprechend drei Kanäle: Rot, Grün und Blau (RGB) benutzt.

Die Begrenzung auf die drei Kanäle bzw. Wellenlängen Rot, Grün und Blau bei RGB-Aufnahmen ermöglicht eine einfache Auswertung der einzelnen Farbkomponenten (Farbton, Sättigung und Intensität), auch als HSI-Komponenten (hue, saturation, intensity) bekannt. HEHMKE et al. (2007) nutzten zur Identifizierung der von Partieller Taubährigkeit erkrankten Weizenähren eine konventionelle Digitalkamera (Minolta) mit einer optischen Auflösung von 6 Millionen Pixel. Unter Verwendung verschiedener Klassifikationsmethoden wurden Erkennungsraten bis zu 89% bei Außenlichtbedingungen erreicht.

Speziell die Erkennung von *Fusarium* head blight geschädigten Körnern gelang unter Auswertung von RGB-Bildern mit 90%iger Wahrscheinlichkeit (WIWART et al. 2001). Zwischen den Farbkomponenten HSI und dem bei Erkrankung verringerten Tausendkorngewicht konnten hohe Korrelationskoeffizienten gefunden werden.

Obwohl RGB-Aufnahmen Symptome der Partiellen Taubährigkeit ebenfalls gut darstellen, wurde in der vorliegenden Arbeit diese Methode nicht weiter bearbeitet, da HEHMKE et al. diese Methode in vorangegangenen Untersuchungen zur *Fusarium*-Erkennung bereits ausführlich bearbeitet hatten.

1.4.3.2 Multispektralaufnahmen

Bei multispektralen Messungen werden zahlreiche Wellenlängen (meist ≤ 10) aufgenommen (FIRTHA et al. 2008). In der multispektralen Bildanalyse hat man entsprechend zahlreiche Aufnahmen bei bestimmten engen Wellenlängenbereichen

(Bändern), die analysiert werden können. Die diskreten spektralen Bereiche werden meist durch Setzen von Bandpassfiltern definiert, die sich wiederum vor der Kameralinse befinden (CHEN et al. 2002). Auf diesem Prinzip werden oft Multispektralkameras als Dreikanalkameras gebaut, aber auch Zwei-, Vier- oder Sechskanalkamerasysteme sind marktüblich.

Die Begrenzung auf nur wenige Kanäle bzw. Wellenlängen wie Rot, Grün, Blau, NIR oder wenige andere Kanäle bei Multispektral-Aufnahmen mit z. B. kommerziellen Landsat-Spektrometern sind für viele Fragestellungen von Vorteil. Sie begrenzen nicht nur die Aufnahme- und Verrechnungs- bzw. Auswertezeit, sondern auch die Kosten der Geräteanschaffung. Zur Unterscheidung beispielsweise von Vegetation und Boden werden die deutlichen Unterschiede der spektralen Eigenschaften dieser unterschiedlichen Medien ausgenutzt. So absorbiert Vegetation viel Licht im sichtbaren Spektralbereich (VIS 400-700 nm), d. h. relativ wenig Licht wird in diesem Bereich reflektiert. Im nahen Infrarotbereich (700-1300 nm) hingegen wird die meiste Strahlung reflektiert. Boden, Gestein, Wasser, aber auch tote Vegetation besitzen nicht diesen vegetationspezifischen Unterschied im Reflexionsverhalten. Mittels eines Indexes, dem NDVI (Normalised difference vegetation index = normalisierter differenzierter Vegetationsindex), wird das Verhältnis $(\text{NIR}-\text{Rot})/(\text{NIR}+\text{Rot})$ gebildet und eine Differenzierung der Pflanzen vom Untergrund kann erfolgen (BRAVO et al. 2003, KUCKENBERG et al. 2009, LAGUETTE et al. 2004, NIEUWENHUIZEN et al. 2010).

Bei der Steuerung von Düngegaben bzw. der Überwachung der Nährstoffversorgung spielt das Chlorophyll neben weiteren Faktoren wie Bestandesdichte, Entwicklungsstand der Pflanzen und Sortenwahl die entscheidende Rolle. Von dem eingestrahnten Gesamtspektrum des Lichtes wird der Anteil der Wellenlängen im blauen (ca. 450 nm) und roten Bereich (ca. 650 nm) durch das Chlorophyll im Pflanzenbestand absorbiert und deshalb nur in geringen Mengen reflektiert. Im Gegensatz dazu wird ein hoher Anteil des Nahinfrarot(NIR)-Lichtes reflektiert. Wenn sich die grünen Flächen des Bestandes erhöhen, die Bestandsdichte durch Wachstum zunimmt oder der Chlorophyllgehalt steigt, sinkt der Anteil der Reflexion im roten Wellenlängenbereich während die Reflexionsintensität im NIR hoch ist. Der verfügbare Stickstoff bewirkt eine Zunahme dieser Parameter und wirkt sich steigend auf das Rot zu Infrarot-Verhältnis aus (REUSCH 1997).

Mittlere und starke Verunkrautungen von Getreide- und Gemüsebeständen kann durch Setzung von Grenzwerten abhängig vom Entwicklungszeitpunkt wiederum mithilfe des NDVI und damit erzeugter Binärbilder erkannt werden (HAAGAR et al. 1983, SÖKEFELD et al. 2002, JACOBI et al. 2006).

Für die Erkennung von Krankheiten wurden ebenfalls Kameras bzw. Spektrometer eingesetzt, die sich auf wenige Kanäle beschränken. WEST et al. (2003) verweisen darauf, dass die Verwendung der Kanäle NIR, Grün und Rot üblich und sinnvoll ist, da die meisten Krankheiten zu Veränderungen der Blattpigmente, insbesondere des Chlorophylls, führen (BAUER et al. 2009, MAHLEIN et al. 2009, NICOLAS 2005).

Durch Kombination von Laboraufnahmen einerseits mit einer RGB- andererseits mit einer NIR-Kamera und einer Klassifizierungsmethode, die bestimmte Feldsegmente zusammenfasst, konnten Infektionen mit *Cercospora beticola* an Zuckerrüben zu 99% detektiert werden (BAUER et al. 2009). Auch virale Infektionen, verursacht z. B. mit dem Tabakmosaikvirus (TMV), konnten durch Verringerung des Verhältniswertes von 710 nm zu 690 nm bei Tabakpflanzen nachgewiesen werden (POLISCHUK et al. 1997).

Die multispektrale Erkennung zweier Getreideerkrankungen, von Mehltau (*Blumeria graminis*) und Blattrost (*Puccinia recondita*), wurde in der Auswertung von Fernerkundungsdaten (QuickBird- und HyMap-Daten) sowie feldspektroradiometrischer Messungen (ASD FieldSpec Pro) versucht (FRANKE und MENZ 2007). Es war schwierig, wie geplant Karten zum Fungizideinsatz zu erstellen, da es gerade in den frühen Entwicklungsstadien zu Missklassifikationen kam und die Anzahl der Mess- bzw. Überwachungstermine nicht ausreichte. Für die Erstellung einer prognostischen Ertragskarte auf der Grundlage der Schwere der Infektion waren hingegen die Aufnahmen und die Klassifikation möglich. Entlang eines Entscheidungsbaumes (decision tree) mit Verwendung des NDVI und einem auf Prinzipieller Komponentenanalyse (PCA) beruhenden Filterungsschritt MTMF (mixture tuned matched filtering) wurden die Bildpixel zu allen Aufnahmezeitpunkten entsprechend zugeordnet.

In einer anderen Arbeit von FRANKE et al. (2005) wurde Blattrost mittels einer 3-Kanal-Kamera (MS3100, Kanäle: NIR, Rot, Grün) ebenfalls nur mit mäßiger Genauigkeit klassifiziert, weil gerade in den beiden ersten Messterminen (bis 17 dai) nur wenige Pixel richtig als infiziert klassifiziert werden konnten. Das multispektrale Messsystem ist anfällig gegenüber externen Faktoren (FRANKE et al. 2005). Probleme gibt es z.B. mit überbelichteten Bildpixeln, die nicht mehr eindeutig in die Klassen „gesund“, „rostinfiziert“ und „seneszenten Weizen“ zugeordnet werden. Hier wird die erweiterte Aufnahme des spektralen Umfanges favorisiert. Letztendlich können mithilfe komplexerer Aufnahmen diejenigen Wellenlängenbereiche für spezifische Krankheiten oder Wachstumsstörungen gefunden werden, die wiederum mit einfacheren multispektralen Aufnahmegeräten aufgenommen und ausgewertet werden können.

1.4.3.3 Hyperspektralaufnahmen im VIS (400-700 nm) und NIR-Bereich (700-3000 nm)

Die hyperspektrale Bildanalyse erweitert die multispektrale Bildanalyse durch Aufnahme von hunderten von zusammenhängenden Wellenlängen (FIRTHA et al. 2008) und hat den entscheidenden Vorzug, dass jedem Bildpixel eine spektrale Signatur hinterlegt wird (CHEN et al. 2002).

Die Nutzung von hyperspektralen Aufnahmen bringt den Vorteil, frei in der Auswahl von Verhältnisbildungen verschiedener Wellenlängen(bereiche) zu sein, verschiedene Indices zu berechnen und letztendlich die optimale Auswertung für die Fragestellung herauszuholen.

So gelang es z. B. aus ursprünglich 167 aufgenommenen Wellenlängenbändern sowohl im VIS- als auch NIR-Bereich, zehn optimale Wellenlängen über zwei Selektionsmethoden (Diskriminanzanalyse und Neuronale Netzwerkverknüpfung) zu finden, die eine optimale Unkrauterkennerung in Zuckerrübenbeständen ermöglichen (NIEUWENHUIZEN et al. 2010). Spektren von Zuckerrübenblättern, die mit drei verschiedenen Erregern (*Cercospora beticola*, *Erysiphe betae* und *Uromyces betae*) infiziert waren, konnten mit Hilfe von sechs verschiedenen Vegetationsindices im Verlauf von drei Wochen untereinander und von gesunden Blättern unterschieden werden (MAHLEIN et al. 2009).

Zur Unterscheidung von verschiedenen Rostpilzen bei Weizen wurden aus einem breiten aufgenommenen Spektrum (400-900 nm) verschiedene Vegetationsindices berechnet, wobei die Unterscheidung zum Gelbrost (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) recht einfach

gelang, die Differenzierung zwischen *P. graminis* f. sp. *tritici* und *P. triticina* aber nur durch mehrere, nachfolgend angewandte Indices möglich war (DEVADAS et al. 2009).

Kalibrierte Spektrometer mit integriertem Auswertesystem, sogenannte Spektroradiometer, werden benutzt, um verschiedene Pflanzenkrankheiten im Feld detektieren zu können. Anhand veränderter spektraler Signaturen im Wellenlängenbereich 350-900 nm konnten unterschiedliche Befallsgrade mit *Drechslera tritici-repentis* im Weizen erkannt werden (MUHAMMED und LARSOLLE 2003). Die Unterscheidung gelang in vier Stufen. Mit zunehmendem Schweregrad der Erkrankung erhöhten sich die Reflexionswerte im Bereich zwischen 550-750 nm, während sich die Reflexion im NIR-Bereich bei hohen Befallsgraden (ab ca. 50%) verringerte.

Das Spektroradiometer Li-Cor Li 1800 ermöglichte eine Krankheitserkennung bei mehltauinfizierten Gerstenpflanzen im Bereich von 400-1100 nm (LORENZEN und JENSEN 1989). Die unter kontrollierten Bedingungen durchgeführten Messungen zeigten bei den befallenen Pflanzen sechs Tage nach Inokulation signifikante Änderungen im visuellen Spektralbereich (422-712 nm). Zehn Tage nach Inokulation erhöhte sich die spektrale Reflexion in diesem Bereich weiter, während Änderungen im NIR nur gering ausfielen. Deutliche Veränderungen in einem umfassender gemessenen NIR-Bereich konnten hingegen durch veränderte Wassergehalte zwischen gesunden und mit *Puccinia striiformis* West. infizierten Weizenpflanzen zwischen 1400 und 1500 nm festgestellt werden (HELLEBRAND et al. 2006).

Nicht die Krankheitssymptome der Partiellen Taubährigkeit, sondern vielmehr die *Fusarium*-geschädigten Körner selbst konnten mittels hyperspektraler Bildanalyse detektiert werden. Im VIS bis NIR-Bereich wurden mittels Prinzipieller Komponenten-Analyse (PCA) sechs Wellenlängen gefunden, mit der eine Erkennung erkrankter Körner mit 92%iger Genauigkeit in der linearen Diskriminanzanalyse möglich war (SHAHIN und SYMONS 2011). Zwei hochauflösende hyperspektrale Bildanalysesysteme („Spectral Dimensions Matrix“-NIR-Kamera mit einem Indium-Gallium-Arsen-Detektor für den Bereich 960-1662 nm und ein sisuChema SWIR- Bildanalysesystem mit einem Quecksilber-Cadmium-Tellur-Detektor für den Bereich 1000-2500 nm) wurden genutzt, um *Fusarium verticilloides*-Infektionen bei Maiskörnern zu erkennen. Anhand weniger Wellenlängen, d. h. 1960 nm und 2100 nm für die infizierten und 1450 nm, 2300 nm und 2350 nm für die nichtinfizierten Körner, gelang die Zuordnung mit einem Determinationskoeffizienten von 0,73 (Matrix-NIR-Bildanalyse) bzw. 0,86 (sisuChema SWIR-Bildanalyse) (WILLIAMS et al. 2010). In Übereinstimmung mit PEIRIS et al. (2009) werden die Veränderungen im Bereich zwischen 1360 nm und 1600 nm sowie zwischen 1960 nm und 2100 nm auf Veränderungen der Kohlenhydrate und Proteine zurückgeführt.

Mithilfe von NIR-Spektren (940-1700 nm) und einer Klassifikation, die die Kornmasse und die Differenz des logarithmierten Reziprokwertes bei 1182 nm und 1242 nm berücksichtigt, konnten sehr gut *Fusarium*-geschädigte Weizenkörner mit bis zu 95%iger Genauigkeit unter praxisnahen Bedingungen erkannt werden (DELWICHE 2003). PEIRIS et al. (2009) und DOWELL et al. (1999) nutzten die NIR- Absorption, um den Gehalt an DON, verursacht durch *Fusarium*-Infektionen, zu bestimmen. Nach einem vorherigen Extraktionsschritt in Acetonitril wiesen DON-belastete Weizenkörner abhängig vom Kontaminationsgrad Unterschiede bei 1204 nm, 1365 nm und 1700 nm auf. Deutliche Unterschiede zwischen DON-freiem und DON-belastetem Material traten in den Spektren bei 1425-1440 nm und 1915-1930 nm auf (PEIRIS et al. 2009). Dennoch bleibt ungewiss, inwieweit sich unterschiedliche Pilzinfektionen der Körner mittels NIR unterscheiden lassen, da beispielsweise *Penicillium* spp. und *Aspergillus*-Arten bei ähnlichen

Wellenlängen (1284 nm, 1316 nm, 1347 nm) wie *Fusarium* Auffälligkeiten zeigen (SINGH et al. 2007) und sich wahrscheinlich die Kohlenhydrate, Proteine und Lipide unter einer Pilzerkrankung ähnlich verändern. Mehl, welches teilweise aus *Fusarium*-belasteten Weizenkörnern gewonnen wurde, zeigte bei Erhöhung des *Fusarium*-Anteils deutliche Unterschiede im aufgenommenen Spektrum von 200-2500 nm (SIUDA et al. 2006). Als beste Methode der Spektrenvorverarbeitung geben die Autoren die Bildung der ersten Ableitung von zentrierten, mit Savitzky-Golay-Glättungsfilter geglätteten Spektren an. Auch hier erhöht eine *Fusarium*-Infektion den Protein- und Lipidanteil, senkt aber den Feuchte- und Stärkeanteil.

POLDER et al. (2005) verwendeten die Transmissionsbildanalyse (transmission spectral imaging) sowohl im VIS als auch NIR-Bereich, um dann die spektralen Informationen mit dem *Fusarium culmorum*-DNA-Gehalt mittels PLS zu verknüpfen. Sie nutzten im Gegensatz zu PEIRIS et al. (2009) und DOWELL et al. (1999) ImSpectoren mit gekoppelter Kamera, was eine spektrale Bildanalyse ermöglichte. Wie bereits bei der CFA beschrieben, können gerade durch die Verknüpfung von spektralen Informationen mit der räumlichen Verteilung durch die Bildanalyse Pflanzenkrankheitsmuster bzw. Schädigungen erkannt werden (NILSSON 1995, Kap. 1.3.2.4).

1.5 Zielstellung der Arbeit

Im Kapitel 1.2 konnte verdeutlicht werden, dass die Erkrankung an Partieller Taubährigkeit ökonomisch und im Sinne der Nahrungsmittelsicherheit bedeutsam ist. Die Erkennung von Krankheitssymptomen schon auf dem Feld wäre ein bedeutender Schritt zur Risikominderung. Ziel dieser Promotion ist es daher, die vorhandenen bildgebenden Methoden der Chlorophyllfluoreszenzkinetik und der Hyperspektralanalyse für die Erkennung von Partieller Taubährigkeit an Winterweizen anzuwenden und geeignete Verfahren zu entwickeln, die eine schnelle Auswertung und Anwendung der Messergebnisse ermöglichen.

Hinsichtlich der CFA sollten folgende Ziele erarbeitet werden:

- (1) Im Gegensatz zu anderen pflanzlichen Pilzerkrankungen wurde die CFA bisher noch nicht zur Analyse von Partieller Taubährigkeit bei Weizenbeständen genutzt. Ziel war es, die Applikationsmöglichkeiten der Methode zur Erkennung von *Fusarium*-Infektionen zu prüfen.
- (2) Ein optimierter Auswertalgorithmus sollte erstellt werden, der die stark zunehmende variierende räumliche Verteilung der photosynthetischen Effizienz mit fortschreitendem Fusariumbefall berücksichtigt.
- (3) Darüber hinaus sollte das optimale Zeitfenster für eine erfolgreiche frühe Detektion von Partieller Taubährigkeit evaluiert werden. Dies ist wichtig, um Befallskarten für eine getrennte Beerntung des Bestandes im laufenden Jahr zu erstellen und gegebenenfalls phytosanitäre und pflanzenbauliche Maßnahmen im Folgejahr einzuleiten.
- (4) Die Detektionsgenauigkeit mittels CFA sollte bei unterschiedlichen Befallsgraden bestimmt werden.
- (5) Im Anschluss an die Labormessungen sollte die Methode unter Feldbedingungen getestet und dabei speziell die möglichen Störgrößen direktes Sonnenlicht, zu enge Bestandsdichte, variierender Abstand berücksichtigt bzw. evaluiert werden.

Der für diese Arbeit zur Verfügung stehende hyperspektrale Messplatz (im Bereich von 400-1000 nm) war nur unter Laborbedingungen einsetzbar. Die Aufnahme und Auswertung der Spektren erfolgte mit den Zielen:

- (6) Bestimmung der distinkten Wellenlängenbereiche, die sich durch die Erkrankung verändern und zu einer erfolgreichen Diskriminierung von Partieller Taubährigkeit führen.
- (7) Finden des optimalen Entwicklungsstadiums für eine Krankheitsdetektion.
- (8) Ausarbeitung einer neuen und einfach anwendbaren Klassifikationsmethode unter semi-praktischen Bedingungen.
- (9) Bewertung, wie akkurat die Spektren von kranken und gesunden Ähren bei unterschiedlichen Entwicklungsstadien getrennt werden können.
- (10) Einbeziehung stetiger und unstetiger Merkmale (roter Sporenbelag) bei der automatisierten Krankheitserkennung und Beurteilung ihrer Auswirkungen auf die Erkennung.
- (11) Auswahl, Anwendung und Optimierung eines geeigneten Klassifizierungsalgorithmus der überwachten Klassifikationsmethoden zur Krankheitserkennung. Die höchstmöglichen Detektionsgenauigkeiten der *Fusarium*-Infektion sollten benannt werden. Die Klassifikationsergebnisse sollten nicht nur zu einem Stadium mit ausgeprägten Symptomen, sondern im Entwicklungsverlauf der Krankheit evaluiert werden.
- (12) Beurteilung, welchen Effekt der Befallsgrad auf die Detektionsgenauigkeit der HSA hat.

Dabei sollten als übergeordnetes Ziel die Vor- und Nachteile beider Methoden bei ihrer Applikation zur Krankheitserkennung von *Fusarium*-Infektionen herausgearbeitet werden als Voraussetzung, diese Methoden unter Feldbedingungen einzusetzen.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

Für die Untersuchungen wurden sowohl Weizenpflanzen genutzt, die im Gewächshaus unter kontrollierten Bedingungen aufgewachsen waren als auch Freilandpflanzen. Zur Herbeiführung einer Erkrankung an Partieller Taubährigkeit wurde ein Teil der Gewächshaus- und Freilandpflanzen mit *Fusarium culmorum*-Sporen besprüht.

Die Gewächshauspflanzen (Sorte „Taifun“) wurden in Töpfen (18 cm x 18 cm; je 4 Töpfe für Kontrollen und inokulierte Weizenpflanzen) ausgesät und angezogen (je 16 Weizenkörner pro Topf). Mit Beginn der Blüte wurden die Pflanzen an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit einem Erregergemisch des Stammes *Fusarium culmorum* mit einer Sporendichte von 250.000 Sporen ml⁻¹ besprüht. Um den Inokulationserfolg zu garantieren, wurden die Pflanzen bei 20 ± 2°C, hoher Luftfeuchte (70%) und einer Beleuchtungszeit von 12 h (Natrium-Hochdruck-Dampflampe, SON-T Plus 400 W, Philips GmbH, Hamburg, Germany) weiter kultiviert.

Geringer Thrips-Befall und sporadisch auftretender Mehltaubefall (*Erysiphe graminis*) wurden toleriert und nicht mit Pestiziden bzw. Fungiziden bekämpft, um mögliche Auswirkungen auf die *Fusarium*-Infektion zu vermeiden, da die meisten Pflanzenschutzmittel Breitbandwirkstoffe enthalten. In 14-tägigem Abstand wurden die Kontroll- und inokulierten Pflanzen mit einer 1%igen Combiflor-Lösung (ADB Coswig, Coswig, Germany) gedüngt.

Im Feldversuch wurden Pflanzen der Sortenresistenzversuche des Julius-Kühn-Institutes, Braunschweig, genutzt, die durch eine fünffache künstliche Sprühinfektion mit 50.000 Sporen ml⁻¹ mit dem Stamm *Fusarium culmorum* typische Symptome von Partieller Taubährigkeit zeigten. Die Inokulation wurde mit einer Rau-Feldspritze (Kverneland Group Deutschland GmbH, Soest, Germany; Sprühweite 24 m) ab BBCH-Stadium 61 jeden zweiten Tag durchgeführt.

2.2 Experimentelle Durchführung

Die Entwicklungsstadien der Ähren wurden dreimal pro Woche entsprechend der BBCH-Skala (LANCASHIRE et al. 1991) aufgenommen. Die BBCH-Skala beschreibt phänologische Entwicklungsstadien beginnend mit trockenem Samen (BBCH 00) und endend mit dem Ernteprodukt (BBCH 99). Der Anteil abgestorbener bzw. erbleichter Ährchen wurde anhand von schematischen Beispielabbildungen infizierter Ähren (WALTHER et al. 2000) geschätzt und damit der Grad der *Fusarium*-Infektion visuell bestimmt. Die Infektion wurde in den Schritten 1%, 2%, 3%, 5% und zwischen 10% und 100% in 10%-Schritten geschätzt.

Mit dem Ziel, die Symptome an den Ähren eindeutig einer *Fusarium*-Infektion zuzuordnen, wurden am Ende jeder Versuchsreihe Ähren- und Kornparameter sowie Mykotoxingehalte bestimmt. Die Körner pro Ähre wurden gezählt, gewogen und hinsichtlich Krankheitsbefallsmerkmale visuell beurteilt. Wegen des geringen Probenumfanges wurden drei Befallsklassen und zwei Kontrollen jeweils zusammengefasst. Zur Bestimmung der Mykotoxinbelastung wurde der ELISA-Test (RIDASCREEN®FAST DON, r-Biopharm, Darmstadt, Germany) ausgewählt. Nach Trocknung (48 h bei 60 °C) der Proben (5 g in Doppelbestimmung) wurden sie mit einer

Messermühle (GRINDOMIX GM200, Retsch GmbH, Haan, Germany) 25 s bei 10000 rpm vermahlen. Zu jeweils 5 g des zerkleinerten Probenmaterials wurden 100 ml destilliertes Wasser hinzugefügt, 3 Minuten kräftig geschüttelt und der Extrakt durch einen Papierfilter filtriert. 50 µl Filtrat pro Kavität wurden im Test eingesetzt. Die photometrische Kalibrierung lag zwischen 0,2 und 6 ppm (200-6000 µg kg⁻¹ DON; DITZ et al. 2011).

Für die Aufnahmen von CFA- und Hyperspektralbildern wurden intakte Pflanzen genutzt. Die Untersuchungen starteten unmittelbar nach Inokulation (BBCH-Stadium 65) und wurden bis zur Reife (BBCH-Stadium 89) dreimal wöchentlich durchgeführt. Zur Dokumentation wurden die Pflanzen jeweils zusätzlich mit einer Digitalkamera Canon EOS 400D (Canon Inc., Tokyo, Japan, Auflösung: 10,1 Megapixel) aufgenommen.

Eine genaue Auflistung der durchgeführten Experimente und erhobener Daten ist in Tab. A10 im Anhang zu finden.

2.2.1 Chlorophyllfluoreszenzbildanalyse

2.2.1.1 Aufbau des Messplatzes für Laboruntersuchungen

Die Chlorophyllfluoreszenz-Bildanalyse erfolgte mit dem modularen System FluorCAM 700MF (PSI, Brno, Czech Republic), welches Sequenzen von Fluoreszenzbildern aufnimmt. Zeitliche Vorgaben bei der Setzung spezieller Messpunkte und -intervalle sowie der Bestrahlungsstärke können benutzerdefiniert eingestellt werden (NEDBAL et al., 2000b, HERPPICH 2001, 2002).

Die Grundfluoreszenz F_0 wird durch zwei Paneele von je 345 orangefarbenen ($\lambda_{\max} = 620$ nm) Leuchtdioden induziert. Die maximale Fluoreszenz (F_m) wurde durch einen kurzen (1 s), sehr starken (max. 2500 µmol Photons m⁻² s⁻¹) Lichtpuls (Sättigungspuls) ausgelöst. Dieser Lichtsättigungspuls wird durch eine Halogenlampe (12 V, 250 W) hervorgerufen, die einen elektronisch angesteuerten Verschlussmechanismus besitzt. Eine CCD-Kamera mit einem F1.2/2.8-6 mm Objektiv und Kurzpassfilter nimmt die Fluoreszenzbilder (12-bit, 512 x 512 Pixel; maximale Frequenz 50 Bilder s⁻¹) synchron mit einem schwachen, nichtaktinischen Messlichtimpuls auf (Abb. 5). Das System wird durch die Software FluorCAM (v 5.0; PSI, Brno, Czech Republic) gesteuert.

Alle Messungen wurden an mindestens 10 min dunkeladaptierten Pflanzen durchgeführt, wobei jeweils sechs definierte Ähren pro Variante aufgenommen wurden. Der Abstand zwischen Ähre und CCD-Kamera betrug 20 cm. Die Dauer der Messung von F_0 und F_m betrug 4 s.

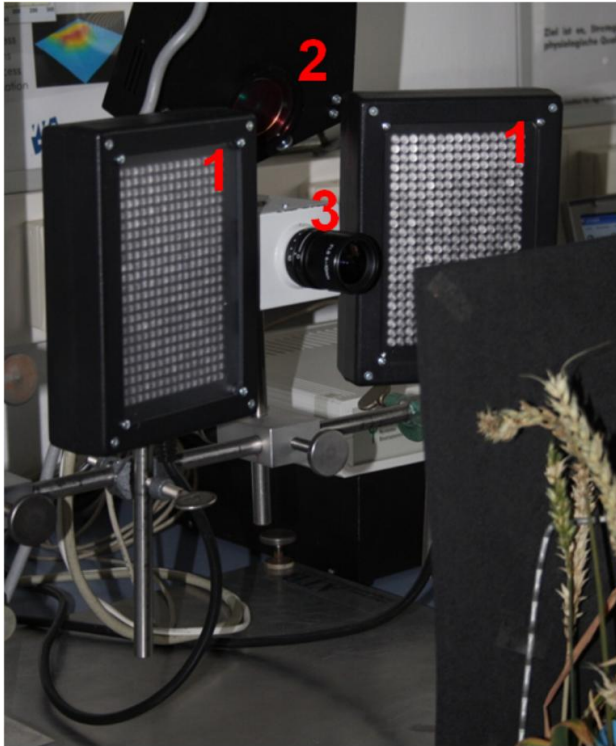


Abbildung 5: Aufbau des Chlorophyllfluoreszenzmessplatzes; [1] LED-Felder (Messlicht); [2] Halogenleuchte; [3] CCD-Kamera.

Für die Analyse der Krankheitsentwicklung und ihrer Verteilung an der Weizenähre wurden die Parameter F_v/F_m und F_v/F_0 genutzt. Das Verhältnis F_v/F_m ($F_v = F_m - F_0$ = variable Fluoreszenz) ist ein Maß für die potentielle maximale photochemische Effizienz von PSII und daher ein wertvolles Werkzeug sowohl zur Bestimmung der Kapazität als auch Stabilität der Photosynthese (VON WILLERT et al. 1995). Die Werte reichen von 0 (chlorophyllfrei, abgestorbene Pflanzen) bis 0,84 für gesunde, intakte Pflanzenteile unter optimalen Bedingungen (VON WILLERT et al. 1995). Dagegen gibt F_v/F_0 nach BUSCHMANN et al. (1999) die maximale Quantenausbeute der Fluoreszenz an.

Für die weitere Bewertung und Ableitung des Befallsgrades musste ein neuer Ansatz geschaffen werden (BAURIEGEL et al. 2010). Die ungleichmäßige Verteilung der photochemischen Effizienz innerhalb einer Ähre – ein charakteristisches Merkmal dieser Erkrankung – sollte in einem Parameter ausgedrückt werden. Dazu wurden sowohl F_v/F_m als auch die F_v/F_0 -Pixelwerte der Chlorophyllfluoreszenz-Bildaufnahme in „Effizienzklassen“ der photosynthetischen Aktivität mit einer Klassengröße von 0,05 eingeteilt. Anschließend wurden sie nach der Berechnungsformel (1a) akkumuliert zu einem „kumulativen F_v/F_m “ (%), der mit dem niedrigsten Wert (0,00) startete:

$$\left(F_v/F_m\right)_{\text{kum}} = \left(F_v/F_m\right)_i + \left(F_v/F_m\right)_{i+1} + \dots + \left(F_v/F_m\right)_{i+n} \quad (1a)$$

F_v/F_m = maximale photochemische Effizienz von PS II

i = Klasse

$\Delta = 0,05$

Zur Errechnung des kumulativen F_v/F_m -Wertes bei 0,3 werden 6 Klassen mit einer jeweiligen Schrittweite von 0,05 aufsummiert:

$$\left(\frac{F_v}{F_m}\right)_{\text{kum}0,3} = \sum_{k=1}^6 \left(\frac{F_v}{F_m}\right) \quad (1b)$$

F_v/F_m = maximale photochemische Effizienz von PS II

2.2.1.2 Statistische Auswertung der CFA-Daten

Um die höchste Korrelation zwischen bonitiertem Befall und den kumulativen Werten von F_v/F_m bei den entsprechenden gebildeten Klassen herauszufinden, wurde der SPEARMAN-Korrelationskoeffizient benutzt. Die Korrelation des mittleren kumulativen Anteils von F_v/F_m -Werten der am höchsten korrelierenden Klasse und des mittleren Befallsgrades wurde bestimmt. Dazu wurden 15 Ähren einbezogen, welche an drei verschiedenen Tagen gemessen wurden. Die F_v/F_m -Werte und der bonitierte Befallsgrad wurden nach einer von WALTHER et al. (2000) vorgeschlagenen Berechnungsformel (2) hinsichtlich der Zeitdauer zwischen den Messterminen gewichtet, weil ungleiche Zeitabstände vorlagen:

$$\overline{B}_{\text{Teilstück}} = \frac{1}{D} * \sum_{i=1}^{t-1} \frac{1}{2} (B_i + B_{i+1}) * d_i \quad (2)$$

i : Boniturtermin (i = 1, ..., t)

D : Anzahl der Tage zwischen dem ersten und t-ten Boniturtermin (Boniturzeitraum)

B_i : prozentualer Befall des Teilstückes zum i-ten Boniturtermin

d_i : Anzahl der Tage zwischen dem i-ten und (i+1)-ten Boniturtermin (Boniturabstand)

Für jedes Teilstück liegt folglich ein Wert vor, der den mittleren Befall des Teilstückes über den Boniturzeitraum hinweg beschreibt.

Der WILCOXON-Rangsummen-Test wurde zur statistischen Beurteilung der Unterschiede zwischen Kontrollen und infizierten Ähren während des Infektionsverlaufes angewendet. Alle statistischen Analysen wurden mit SAS 9.13 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) durchgeführt.

2.2.1.3 Messungen im Freiland

In Erweiterung zu den Labormessungen wurde die CFA an künstlich infizierten Winterweizenpflanzen (BBCH-Stadium 77/79) der Sorten 'Cardos', 'Winnetou' und 'Drifter' (alle Resistenzklasse 5) direkt im Feld angewandt. Um Effekte einer direkten Sonneneinstrahlung auf die Fluoreszenz zu vermeiden, als Windschutz und zur

Dunkeladaptation der Pflanzen, wurde jeweils ein kleiner Bestand mit einer Abdeckung (ca. 0,9 m x 0,9 m x 0,9 m) während der Messungen eingehüllt (Abb. 6).

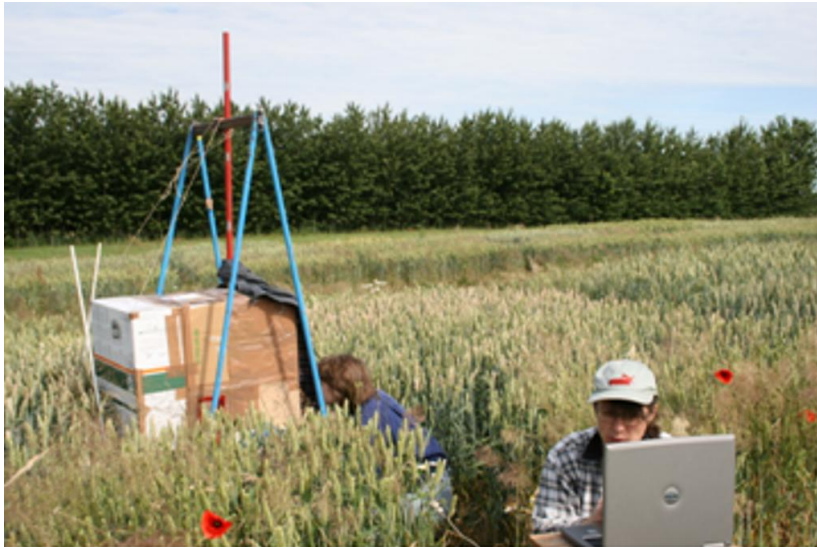


Abbildung 6: Feldmessungen mit der FluorCam MF700.

Die Dauer der Fluoreszenzmessung wurde auf 2 s reduziert (je 1 s für F_0 und F_m). Insgesamt wurden 50 Ähren unterschiedlichen Infektionsgrades aufgenommen. Nur optimal ausgeleuchtete Bilder mit klar trennbaren Ähren ($n=30$) wurden später in diesem Experiment analysiert (Abb. 7)

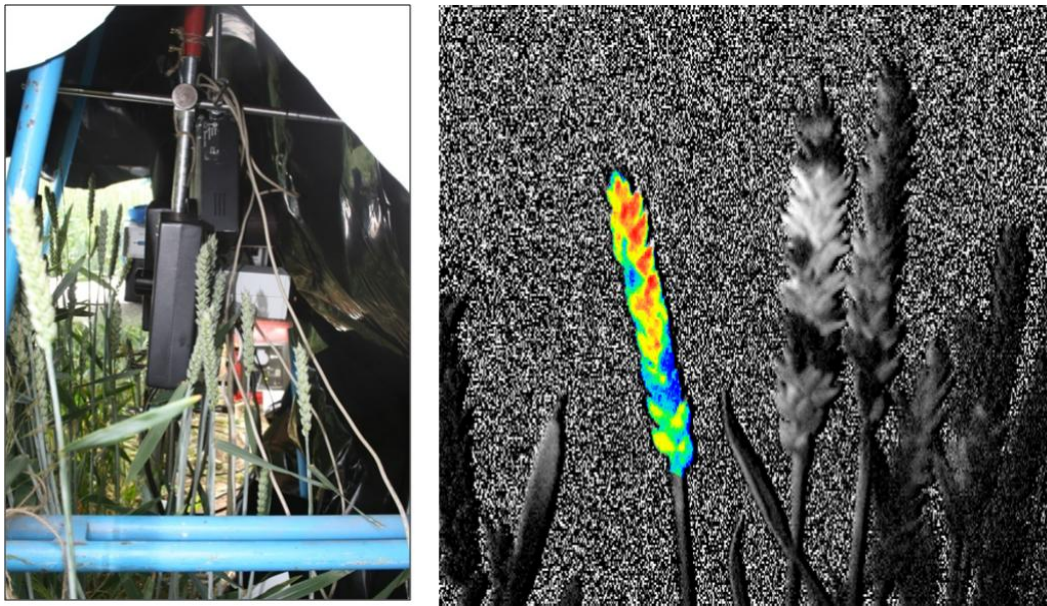


Abbildung 7: Beispielaufnahme einer CFA-Messung im Feldbestand (links: Messapparatur, rechts: Ergebnisbild einer gemessenen Ähre). Die ermittelten photochemischen Effizienzen sind den entsprechenden Gewebebereichen innerhalb der Ähre in einem Falschfarbenbild (blau-niedrig, rot-hoch) zugeordnet.

Die Auswertung der Messungen erfolgte analog der Laborexperimente. Die F_v/F_m -Werte wurden in Klassen (0,05-Schrittweite) eingeteilt und akkumuliert (von niedrigen zu hohen Werten).

2.2.2 Hyperspektrale Messungen

2.2.2.1 Aufbau des Messplatzes

Das am ATB für die Messungen aufgebaute Hyperspektralkamerasystem besteht aus dem Spektrographen (ImSpector V10E, Specim, Oulu, Finnland), einer s/w-Kamera (Pixelfly qe, PCO, Kelheim, Germany), einem zugehörigen Rotationsspiegel (ansteuerbar mit einem microstep Motor) und der Software HyBiS 1.0. Die Reflexionsspektren aller Pixel eines Bildes wurden zeilenweise im Wellenlängenbereich von 400–1000 nm mit einer spektralen Auflösung von 2,5 nm aufgenommen. HyBiS 1.0 wurde mittels LabView 8.2 (National Instruments, Austin, USA) entwickelt. Das Programm steuert das Kamerasystem und dient der Vorverarbeitung der Daten incl. des s/w-Abgleichs der Spektren. Die Proben wurden mit einer stabilisierten 150 W Halogenlampe beleuchtet (3900 Lichtquelle mit 9155 CL Linienbeleuchtung, 16“ Linienlicht, Zeutec Opto-Elektronik GmbH, Rendsburg, Germany). Der hyperspektrale Bildscanner ist ausschließlich für den Laborgebrauch konstruiert (Abb. 8).

Die aufgenommenen Daten enthalten zeilenweise die jeweiligen spektralen Informationen. Im ersten Umwandlungsschritt werden die Informationen so zugeordnet, dass ein Würfel mit den Koordinaten x-y-z entsteht, der in der x-y-Achse die räumlichen Informationen, als z-Achse die spektralen Informationen mit einer Bandbreite von 1,2 nm enthält. Zu jeder Messung wurde ein Bild zum Schwarz-Abgleich (Beseitigung des Instrumentenrauschens) und zum Weiß-Abgleich aufgenommen. Bei der anschließenden

Umwandlung der hyperspektralen Bilder (hyperspectral images – hsi-Format) in das Bytestream-Format wurde der Schwarz/Weiß-Abgleich durchgeführt. Die einzelnen Scans ergaben als 16-bit „unsigned integer image cubes“ mit einer Auflösung von 696 x 512 x 512 Pixel Dateien von ca. 360 MB Speicherplatz. Ein Scan dauerte ca. 20-25 Minuten.

Zur spektralen Messung wurden die Pflanzen im Abstand von ca. 50 cm vor der Kamera platziert. Zur Analyse der spektralen Eigenschaften während des Krankheitsverlaufes (Zeitreihe) wurden zusätzlich zu den 6 Ähren pro Variante, die für die CFA genutzt wurden, weitere 6 Ähren hyperspektral aufgenommen (insgesamt $n_{\text{infiziert}}$ bzw. $n_{\text{Kontrolle}} = 12$). Die Ähren wurden vor einem schwarzen Hintergrund fixiert, um diese unverdeckt und geschützt vor Verwacklungen aufzunehmen.

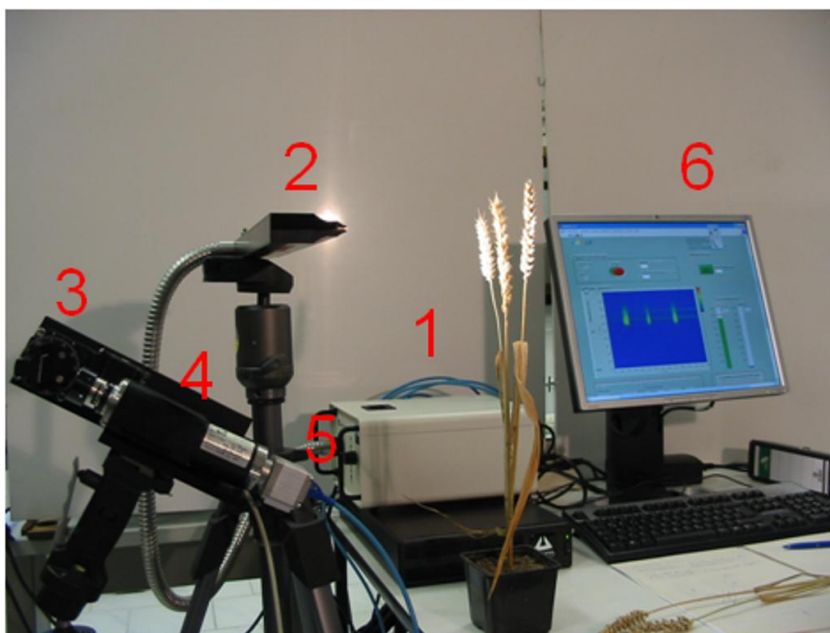


Abbildung 8: Komponenten des Hyperspektralmessplatzes; [1] stabilisierte Lichtquelle / Halogenlampe; [2] Zeilenlicht; [3] Winkelscanner / Drehspiegeleinheit; [4] Spektrograph (ImSpector V10E); [5] 12-bit schwarz/weiß-Kamera; [6] Aufnahmesteuerung über Software HyBis.

2.2.2.2 Datenanalyse (Hyperspektraldaten)

Die weitere spektrale Analyse der Aufnahmen erfolgte im Softwareprogramm ENVI (Research Systems Inc., Boulder, USA), einem umfassenden Programm zur Bildverarbeitung und Hyperspektralanalyse. Zur visuellen Unterscheidung der Symptome von Partieller Taubährigkeit wurden aus den Hyperspektralbildern zunächst RGB-Bilder erstellt mit den drei ausgewählten Wellenlängen bzw. Bändern blau: 450 nm, grün: 550 nm und rot: 650 nm. In diesen RGB-Bildern konnten aufgrund der Anpassung an die visuelle Wahrnehmung des Menschen kranke und gesunde Gebiete der Ähre leicht unterschieden werden. Dieses Verfahren erleichterte auch das manuelle Setzen der „regions of interests (ROIs)“ und die Auswahl der Gewebebereiche für die

Spektralanalyse. Eine repräsentative Auswahl der Hyperspektralbilder wurde als Trainingsbilder genutzt, um die Datengrundlage für die Klassifikation und Hauptkomponentenanalyse (principal component analyses - PCA) zu schaffen. Diese Trainingsbilder wurden von der späteren Auswertung ausgeschlossen.

2.2.2.3 Evaluierung relevanter Wellenlängenbereiche (zur Bildung eines HBI-Indexes)

In einem ersten Schritt wurden die Wellenlängenbereiche bestimmt, die sich am besten zur Unterscheidung der Partiellen Taubährigkeit eigneten (vgl. Zielstellung 6). Aus den Trainingsbildern wurden die Spektren gesunder und kranker Gewebebereiche pixelweise ermittelt und in einer spektralen Bibliothek abgelegt (Abb. 9).

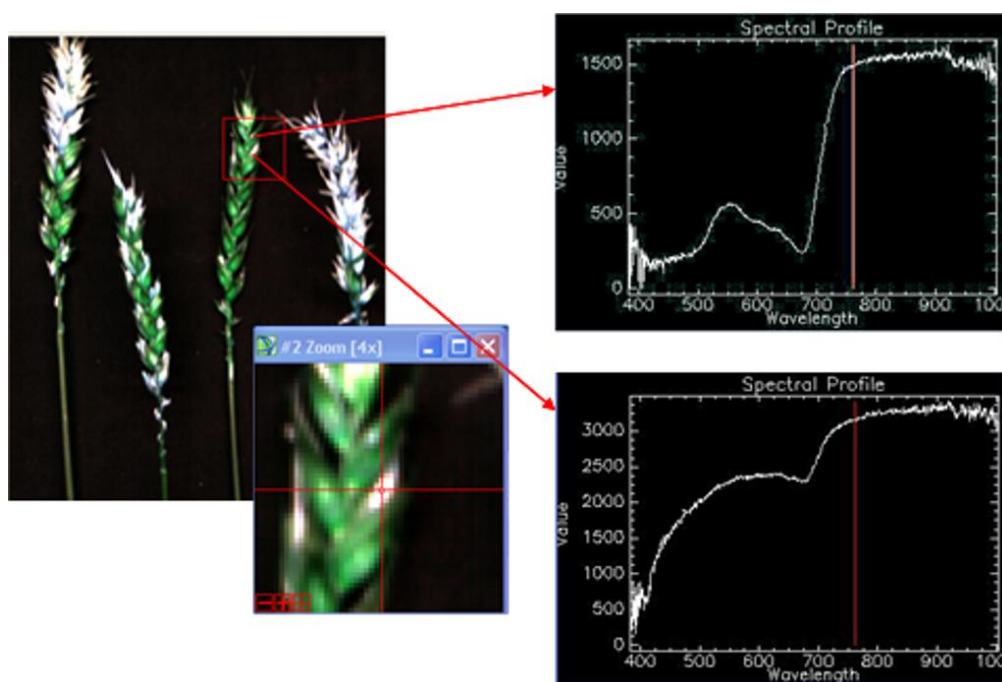


Abbildung 9: Kranke (helle) und gesunde (grüne) Ährenbereiche sind visuell gut im RGB-Bild unterscheidbar und zeigen dementsprechend auch unterschiedliche Spektren (gesunder Bereich: oben und kranker Gewebebereich: unten). Das Zoombild (mittig) erleichtert die genaue Zuordnung.

Um das Infektionserscheinungsbild mit möglichen Variationen und Nuancen umfassend abzudecken, wurden sowohl Feld- als auch Laborpflanzen im Stadium BBCH 75 untersucht. Von zufällig ausgewählten Ähren wurden 104 Spektren von gesunden und kranken Ährchen erfasst. Die Anzahl und Zusammensetzung der verwendeten Einzelspektren zeigt Tab. 3.

Tabelle 3: Datenbasis zur Bestimmung der relevanten Wellenlängenbereiche

	Freiland	Freiland	Labor,	gesamt
	Sorte 1	Sorte 2	‘Taifun’	
gesund	20	20	8	48
krank	15	23	18	56

Zur Beurteilung des optimalen Stadiums der Pflanzen- bzw. Ährenentwicklung für eine präzise Krankheitserkennung (vgl. Zielstellung 7) wurden 292 Spektren kranker und 80 Spektren gesunder Gewebebereiche in einem Zeitreihenexperiment analysiert (Abb. 10). Für jeden der acht Messtermine (beginnend mit BBCH 65 bis zur Reife BBCH 89) wurden gesunde und kranke Ährchen wie oben beschrieben mit Hilfe von Trainingsbildern identifiziert und ihre Spektren in der spektralen Bibliothek gespeichert.

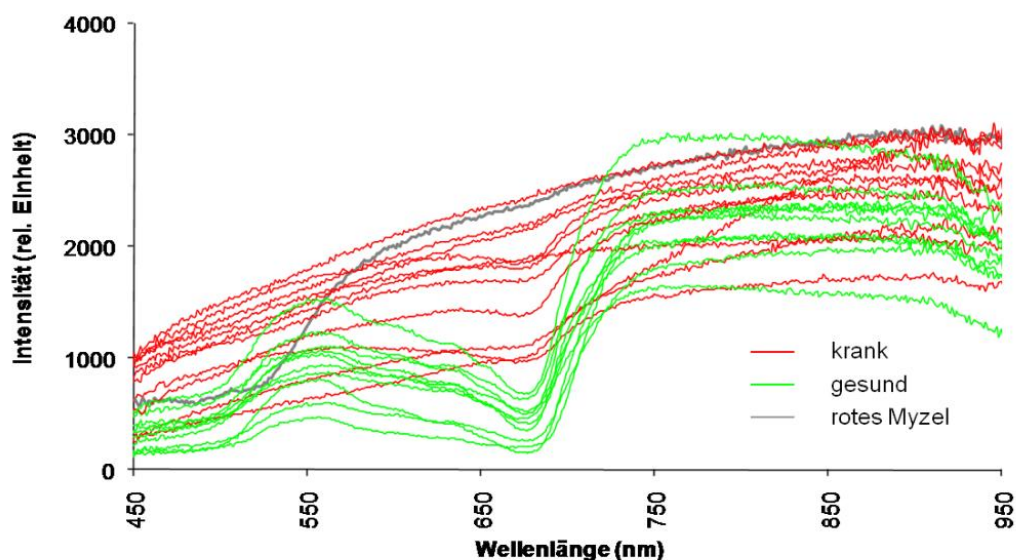


Abbildung 10: Originalspektren, Darstellung je 10 gesunder und kranker Gewebebereiche und des roten Myzels als zusätzliches Merkmal Partieller Taubähigkeit.

Am ersten Messtermin waren bei den inokulierten Ähren keine Chlorophylldefekte erkennbar. Daher wurden die Stellen, die später erkrankten, analysiert. Die relativ kleine Anzahl an Spektren der gesunden Ährchen war ausreichend, weil die Variation der Spektren nur gering war.

Die Spektren wurden in SAS 9.13 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) mit der 'proc expand' Funktion geglättet. Dies bedeutet, dass die Spektren mit dem Faktor 1:3 verdichtet (jede vierte Wellenlänge wurde ausgewählt) und anschließend verdünnt, d. h. wieder auf die ursprüngliche Anzahl gebracht (fehlende Wellenlängen wurden interpoliert mit Faktor 3:1). Danach wurde eine zentrierte gleitende Mittelwert-Glättung über 11 Werte berechnet. Zum Schluss wurden die Spektren mit der Berechnungsformel (3) korrigiert:

Anschließend wurde die erste Ableitung der Spektren mit SAS berechnet, um Unterschiede der gesamten spektralen Signatur gesunder und kranker Gewebebereiche anhand spezifischer Veränderungen im Anstieg der spektralen Kurve zu analysieren (Abb. 11)

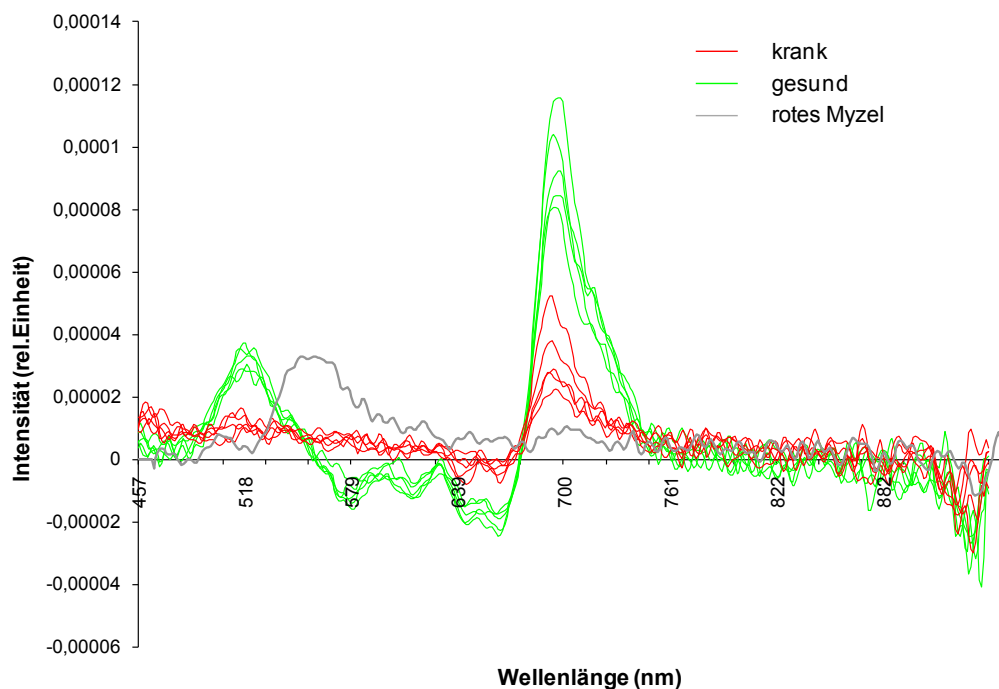


Abbildung 11: Erste Ableitung der Spektren von gesunden bzw. fusariumbefallenen Geweben und von rotem Myzel (Beispielspektren).

Für die Klassifizierung mit dem „head blight index“, wurden spektrale Teilbilder (subsets) in den Bereichen 550-560 nm (C1) und 665-675 nm (C2) erstellt. Mittels der ‘band math’-Funktion in ENVI wurden die entsprechenden Differenzen (C2-C1) aus den beiden spektralen Teilbildern ermittelt. Durch Setzen spezifischer Grenzwerte wurden alle Pixel zu einer von drei Objektklassen „krank“, „gesund“, „Hintergrund“ zugeordnet. Der relative Anteil der als krank klassifizierten Pixel zur Summe der als gesund und krank klassifizierten Pixeln bezifferte den Befallsgrad.

Desweiteren wurden verschiedene Vegetationsindices wie der NDVI (Rouse et al. 1974), das „greenness-band“ ($G = R_{554} / R_{677}$, ZARCO-TEJADA et al. 2005), der „structure intensive pigment index“ ($SIPI = (R_{800} - R_{450}) / (R_{800} + R_{650})$), PEÑUELAS et al. 1995), der „normalised pigment chlorophyll index“ ($NPCI = (R_{680} - R_{430}) / (R_{680} + R_{430})$), PEÑUELAS et al. 1994) und die Lichtenthaler’s indices ($Lic1 = (R_{800} - R_{680}) / (R_{800} + R_{680})$ und $Lic2 = R_{440} / R_{690}$, LICHTENTHALER et al., 1996a,b) in ENVI an ausgewählten hyperspektralen Aufnahmen berechnet.

2.2.2.4 Klassifizierung mit der „Spectral Angle Mapper“ Methode

Der „Spectral Angle Mapper“ (SAM; YUHAS et al. 1992; KRUSE et al. 1993) wurde als Methode der überwachten Klassifikation angewandt. Der SAM-Algorithmus bestimmt die

Ähnlichkeit zwischen zwei Spektren durch Berechnung des spektralen Winkels zwischen ihnen. Dabei werden die Spektren als Vektoren in einem n-dimensionalen Raum dargestellt, wobei n die Anzahl der Spektren bzw. Bänder ist (ENVI TUTORIAL). Bei SAM wird ein Referenzspektrum und ein unbekanntes Spektrum betrachtet und definiert daher eine Klassenzuordnung gemäß der entsprechenden Ähnlichkeit (Abb. 12). Weil SAM nicht die Länge der Vektoren, sondern nur die Richtung der Spektren benutzt, ist SAM kaum anfällig für Beleuchtungsunterschiede.

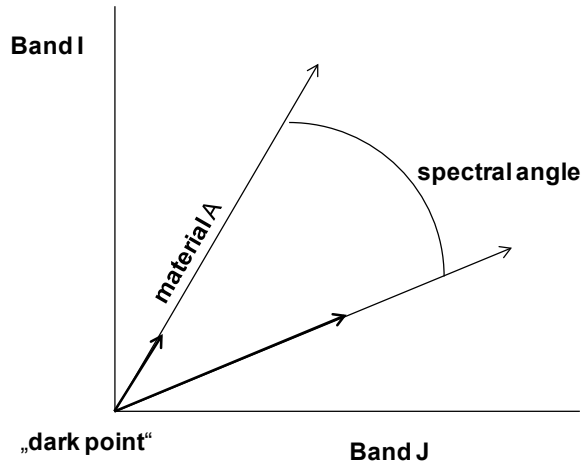


Abbildung 12: Schematische Darstellung des „Spectral Angle Mapper“ – Klassifikationsalgorithmus. Band I und J stellen Beispielbänder dar (ENVI 2010).

Nach Verwendung verschiedener Werte erwies sich in der vorliegenden Arbeit der Schwellenwert des „maxima angles“ 0,1 als optimaler Wert. Eine weitere Senkung dieses Schwellenwertes führte optisch zu einer fehlerhaften Verringerung der klassifizierten Bereiche. Der spektrale Winkel wird nach Gleichungssystemen in ENVI (2010) nach der Formel (4) berechnet:

$$\alpha = \cos^{-1} \left(\frac{\vec{t} \bullet \vec{r}}{\|\vec{t}\| \bullet \|\vec{r}\|} \right) \quad (4)$$

α = spektraler Winkel zwischen den Vektoren

t = spektrale Signatur der Klasse i oder j (Zielpixel)

r = spektrale Signatur der Klasse i oder j des Trainingsbildes (Referenzpixel)

Der Kalkulationsalgorithmus kann auch geschrieben werden als:

$$\alpha = \cos^{-1} \left(\frac{\sum_{i,j=1}^{nb} t_{i,j} r_{i,j}}{\left(\sum_{i,j=1}^{nb} t_{i,j}^2 \right)^{0.5} \left(\sum_{i,j=1}^{nb} r_{i,j}^2 \right)^{0.5}} \right) \quad (5)$$

wobei nb als Laufvariable der Zahl der Bänder im Bild entspricht.

Zu diesem Zweck wurden in Trainingsbildern „regions of interests (ROIs)“ zum Zeitpunkt der besten Symptomausprägung im BBCH 75 als Grundlage für die Klassifikation entsprechend der Objektklassen „krank“ (8 ROIs) und „gesund“ (10 ROIs) gesetzt. Diese 18 ROIs wurden genutzt, um ein „endmember“ (Ziel- bzw. Merkmalsklasse) zu bilden, das in der weiteren Klassifizierung angewandt wurde. Diese Trainingsbilder wurden von einer weiteren Klassifizierung ausgeschlossen. Nach der Klassifizierung wurde pro Bild der relative Anteil an Pixeln bestimmt, der zu den Objektklassen „gesund“, „krank“ bzw. „unklassifiziert“ gehörte. Alle Pixel, die nicht den definierten Klassen „gesund“ und „krank“ zugewiesen werden konnten, wurden der Klasse „unklassifiziert“ zugeordnet. Der Anteil der unklassifizierten Pixel wurde als Differenz zwischen 100% und der Summe von gesunden und kranken Pixeln errechnet.

Datengrundlage waren immer „Sammelaufnahmen“ von 3 bzw. 6 Ähren pro Aufnahme. Die Auswertung der Einzelähren erfolgte nach einer Maskensetzung zur Eliminierung des Hintergrundes (Schwellenwert Grauwert >1000 bei Wellenlänge 800 nm) und dem nachträglichen Separieren der einzelnen Ähren mit einer Setzung von rechteckigen ROIs, die die Einzelähren einschlossen (overlay-Funktion). Diese überlagerten (overlayed) ROIs ermöglichen es, dass die Klassifizierungsergebnisse (Anzahl der Pixel in den Klassen „krank“, „gesund“ bzw. „unklassifiziert“) speziell nur auf diese Einzelähren in den rechteckigen ROIs bezogen werden können.

Um die Güte der Detektionsgenauigkeit durch Verwendung des SAM-Algorithmus` und des HBI-Indexes zu bestimmen, wurden die Residuen und die mittleren Abweichungen der Residuen gebildet [Summe der Residuen / (N-2)].

3 Ergebnisse

3.1 Rapid *Fusarium* head blight detection on winter wheat ears using chlorophyll fluorescence imaging

Dieser Artikel beschreibt das Krankheitsbild und die Infektionsbiologie von *Fusarium* ssp. an Weizen und stellt die Erkennung der Partiellen Taubährigkeit mittels Chlorophyllfluoreszenz in den Mittelpunkt. Der neue bildanalytische Ansatz zu einer genauen und frühzeitigen Detektion der Erkrankung wird vorgestellt.

BAURIEGEL, E., GIEBEL, A., HERPPICH, W. B. (2010): Rapid *Fusarium* head blight detection on winter wheat ears using chlorophyll fluorescence imaging. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 83 (2): 196-203.

Rapid Fusarium head blight detection on winter wheat ears using chlorophyll fluorescence imaging

E. Bauriegel, A. Giebel, W.B. Herppich

(Received March 9, 2010)

Summary

Fusarium infection on wheat is a widespread threat for humans' and animals' nutrition as these fungi are known to produce the highly dangerous mycotoxin deoxynivalenol (DON). Besides this, Fusarium also induces head blight, a disease resulting in huge economic losses due to shrivelled and low mass or dead kernels. Early disease detection could help to reduce yield losses and health threats from DON contamination. The potential of chlorophyll fluorescence imaging (CFI) to yield these aims was investigated in laboratory experiments applying a FluorCam 700MF commercial CFI system. Healthy (control) plants as well as plants artificially infected with Fusarium culmorum were rated visually according to the stage of development and the degree of disease. Subsequently, a chlorophyll fluorescence image analysis of the potential maximum photochemical efficiency (F_v/F_m) was applied to determine the degree and the distribution of the damage of the ears. Between the sixth and eleventh day after artificial inoculation photosynthetic activity of single damaged kernels of diseased ears dropped to zero.

Although this only marginally affected the average maximum photochemical efficiency of entire ears, the infection led to a significant increase in the statistical distribution of F_v/F_m in the images. Pixelwise integration of F_v/F_m -values (from low to high) of the fluorescence images allowed a differentiation, in steps of 10%, between ears of different degree of disease of 10% on in the BBCH stage 75. Lowest level of disease detection by CFI corresponded to a visually rated degree of disease of at least 5%. However, the possibility to distinguish between diseased and healthy ears became highly limited with incipient ripening of kernels and concomitant chlorophyll degradation at growth stage 81.

Abbreviations : CFI – chlorophyll fluorescence imaging, dai – days after inoculation, DON – deoxynivalenol, F_0 - basic fluorescence emission of a dark-adapted plant, F_m - maximal fluorescence emission of a dark-adapted plant, $F_v = F_m - F_0$ - variable fluorescence measured on dark-adapted plant, F_v/F_m - maximum fluorescence yield of PS II (photosynthetic efficiency), PS II - Photosystem II

Introduction

During recent years, Fusarium infections of crops are of increasing public concern due to resulting health threat by mycotoxine contaminations of food (DELWICHE, 2003; DEHNE et al., 2004). These fungi infect all types of grain and various grasses but also dicotyledonous plants (*F. culmorum*). However, durum wheat, oat and triticale are especially prone to ears' infections (<http://www.lfl.bayern.de/ipz/weizen/08468/>). Head blight is mainly caused by the strains *F. graminearum*, *F. avenaceum* and *F. culmorum* (HEITFUSS et al., 1993; LIENEMANN et al., 2002; SCHLÜTER et al., 2006). Infections with Fusarium do not necessarily occur during bloom, but are assumed to take also place via chlamydospores from the ground or infected plant remains (SCHLÜTER et al., 2006). Fusarium are fastidious pathogens, which deaden the tissue of the

host plants. Infected spikelets of the ears will die, which results in chlorophyll losses, becoming visible as head blight (also called scab, DELWICHE, 2003). Finally the disease spreads over the entire ear.

Beside the often discussed allergy supporting effect of Fusarium culmorum (HOFF, 2003), mainly metabolites such as deoxynivalenol (DON), zearalenone and fumonisin produced by the fungi in different amounts are considered to be noxious for humans and animals (DELWICHE, 2003; RAGAB et al., 2005; DLG-WORKING GROUP „MYKOTOXINE“, 2000). Feeding fodder containing DON at concentrations above 1 mg kg⁻¹ DON (at 88% dry matter) causes vomiting and fodder refusal in non-ruminants like pigs. At high concentrations the oestrogenic mycotoxin zearalenon induces infertility and pseudopregnancy (CURTUI et al., 2001; DLG-WORKING GROUP „MYKOTOXINE“, 2000).

However, visual appearance of head blight does not always reflect the detectable mycotoxin contents (MIEDANER and SCHNEIDER, 2002). Obviously, there are a lot of different influences, which either promote growth of Fusarium, or cause the production of the toxins. However, the close correlation between both parameters may form the basis of breed selection. Production of mycotoxins by Fusarium starts in the field but, at high humidity and temperatures between 12 and 25 °C, can continue in the granary (LEONARD and BUSHNELL, 2003). Hence, harvest and storage of grains should be done very carefully.

During the last twenty years, an increase of ear Fusarium infections was reported (DLG-WORKING GROUP „MYKOTOXINE“, 2000; MIEDANER and SCHNEIDER, 2002; DELWICHE, 2003). Among others, intensification of maize cultivation and a shorter ear crop rotation may be the reasons. To protect consumers, a new ordinance about threshold values for those Fusarium toxins had been brought into effect by the EU in June 2005 (Ordinance (EG) Nr. 856/2005 in the European Union, June 2005).

This raises the pressure on farmers and food producers to detect infected grain and to exclude it from harvest. In conventional agriculture, Fusarium infections are preventively treated e.g. by crop rotation, soil turning ploughing after maize cultivation, use of less sensitive species or preventive spraying with azole preparations (MIEDANER and SCHNEIDER, 2002) during periods of climates favouring infections. If Fusarium infections occur despite the preventive treatments, their toxins must be determined by pre- and postharvest tests such as serological rapid tests, Fast-DON-ELISA-tests or counting methods (THATE et al., 2008). However, at present, no fully successful prophylaxis by preventive spraying is applicable nor do truly Fusarium resistant species exist (LIENEMANN et al., 2002; CHRPOVA et al., 2004).

On-field-detection of Fusarium by means of imaging methods may enable a selective harvest directed to highly diseased areas. Imaging methods have been proven to be very promising as they work quickly, efficiently and non-destructively. Furthermore, imaging methods provided a spatial allocation and they can be processed analytically. During recent years, different approaches have been tested. Multispectral image analysis has been applied for disease detection e.g. in the VIS range analysing degradation of chlorophyll (BRAVO et al., 2004; FRANKE et al., 2005; LORENZEN and JENSEN, 1989; POLDER et al., 2009). Furthermore, in the NIR-range, loss of

water and other substances have been used to determine the degree of pathogen infection in crop plants (DELWICHE, 2003; DELWICHE and HARELAND, 2004; SINGH et al., 2007). For the detection of weed, image analysis based on special shape parameters has been used (KLUGE and NORDMEYER, 2009).

In addition, chlorophyll fluorescence imaging (CFI) has been widely applied to evaluate the vitality of plant tissues (HERPPICH et al., 2001; TARTACHNYK and RADEMACHER, 2003). In most cases, based on the ratio of variable fluorescence F_v (calculated $F_v = F_m - F_0$) to maximum fluorescence F_m , CFI was successful in detecting diseases or to determine the degree of ripeness in fruits and vegetables (NEDBAL et al., 2000a).

With CFI, metabolic changes of diseased plants can be recorded (VON WILLERT et al., 1995). Thus, it provides information about a potentially maximum and the actual efficiency of photosynthesis, which is often considerably reduced in stressed or damaged plants. With this measurement of the physiological activity symptoms of a disease can be determined at a very early stage.

Thus, the CFI qualifies for the detection of plant tissue damages caused by herbivory (FORSTREUTER et al., 2006) and freezing (NEUNER and BUCHNER, 1999). In addition, there are reports about studies on the degree of ripening in bananas (HERPPICH, 2002), fungi infestation on lemons (NEDBAL et al., 2000a) or brushing on apples (CHEN, 2009).

The development of different fungal grain diseases caused by *Puccinia recondita* and *Blumeria graminis* (KUCKENBERG et al., 2007) as well as the infection by tobacco mosaic virus (DALEY, 1995) or pepper mild mottle virus (CHAERLE et al., 2006) have been investigated. With quantitative CFI, effects of crown rust (*Puccinia corota*) on oat leaves could have been demonstrated already five days after infection (SCHOLES and ROLFE, 1996). Using F_v/F_m , FÖRSCHLER et al. (2003) found first signs of a *Venturia inaequalis* infection on leaves of apple seedlings seven days after infection. These examples nicely indicate the sensitivity of this method and its ability for early disease detection.

To our best knowledge, up to now there is no report on the application of CFI to rapidly and quantitatively detect the development of *Fusarium* infection on wheat ears. Hence, it was the aim of this research to apply CFI for the analysis of head blight disease on this important crop. Furthermore, the possible time frame for a successful early detection of head blight should be evaluated and detection accuracy of CFI at different degrees of infection determined. This should support a better understanding of the dynamic of the expansion of *Fusarium* infection and may be incorporated into different modelling approaches.

Material and methods

Plant material

In eight pots (18 cm x 18 cm) 16 wheat grains (cv. 'Taifun') per pot (four control pots and four infected pots, respectively) were sown and cultivated in a green house. Plants were inoculated with a germ mixture of the species *Fusarium culmorum* at a spore-density of 250 000 spores per ml on three successive days with beginning of flowering. To guarantee the spread of germs plants were kept at $20 \pm 2^\circ\text{C}$, high humidity (70%) and an illumination period of 12 h (high-pressure sodium-vapour lamps, SON-T Plus 400 W, Philips GmbH, Hamburg, Germany). Measurements started immediately after inoculation.

The degree of *Fusarium* infection of the laboratory plants was rated three times a week estimating the percental affection of the ears according to WALTHER et al. (2000). Developmental stage of ears was graded according to the BBCH-scale. All measurements were performed on intact plants.

Chlorophyll fluorescence imaging

Chlorophyll fluorescence imaging was performed with a modular system (FluorCAM 700MF, PSI, Brno, Czech Republic) measuring sequences of fluorescence images with an user-defined timing of set points, measurement intervals and irradiance (NEDBAL et al., 2000b; HERPPICH 2001, 2002). Basic fluorescence F_0 was induced by two sets of 345 super-bright orange light emitting diodes ($\lambda_{\text{max}} = 620 \text{ nm}$). Photosynthesis was driven by continuous actinic irradiation provided by the LED panels. Maximum fluorescence (F_m) was measured by short-term (1 s) closure of photosystem II as induced by saturation light pulses (max. $2500 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) generated by a electronic shutter-equipped halogen lamp (250 W). A CCD camera with a F1.2/2.8-6 mm objective and a short-pass filter recorded fluorescence images (12-bit, 512×512 pixel; maximal frequency 50 images s^{-1}) synchronously with the weak, non-actinic measuring-light pulses. The system was controlled by the FluorCAM 6 software (PSI, Brno, Czech Republic).

All measurements were performed on dark-adapted (at least 10 min) plants (6 ears per treatment). The duration of the measurement of F_0 and F_m was 4s. For the analysis of the development of head blight and its distribution on the wheat ears the parameters F_v/F_m and F_v/F_0 were calculated from the above fluorescence signals. The ratio F_v/F_m ($F_v = F_m - F_0 = \text{variable fluorescence}$) is a good indicator of the potential maximum photochemical efficiency of PSII, and, thus, a valuable tool to determine both capacity and stability of photosynthesis (VON WILLERT et al., 1995). On the other hand, F_v/F_0 is assumed to reflect the maximum quantum yield of fluorescence (BUSCHMANN et al., 1999).

To compare the CFI results and the visually rated degree of disease, both F_v/F_m and F_v/F_0 values of each fluorescence image were pixel-wise accumulated (from low to high) and divided by the total amount of pixel per image. These cumulative relative fluorescence parameters were class wise analysed further.

Grain yield and mycotoxin determination

The kernels per ear were counted, weighted and visual rated regarding disease degree. Due to the low sample numbers only three disease classes and one control class were defined. For the estimation of the mycotoxin loads, the ELISA-Test (r-Biopharm, RIDASCREEN®FAST DON) was chosen. Three repetitions of control plants and two classes (0-5% and 5-30% degree of disease) of the infected plants were investigated. After drying (48 h at 60°C) the samples (5 g in double estimation) were ground with a mill (GRINDOMIX GM200, Retsch GmbH, Haan, Germany) for 25 s at 10000 rpm. The photometric calibration ranges between 0.2 and 6 ppm ($200\text{--}6000 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ DON}$).

Statistical analyses

The distribution curves of all F_v/F_m -values of the measured ears were calculated as spikelet density-curves. To explore the highest correlation between rating and the proportion of cumulative values of F_v/F_m at 0.3, the SPEARMAN-index was used. For the analysis of the correlation between mean cumulative proportion of F_v/F_m -values at 0.3 and mean degree of disease rating, 15 ears were incorporated, which were measured on three different days. F_v/F_m -values and disease rating were weighted regarding the time duration, because there were non-uniform spaces. The WILCOXON-rank sum test was applied for the statistical evaluation of the differences between control and infected ears during the progressive infection. All statistical analyses were performed by SAS 9.13 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Results

Differentiation of the degree of infection at the BBCH 75 (medium milk)

At the time of medium milk, diseased and healthy spikelets or tissue areas of the ears can be well distinguished by chlorophyll fluorescence imaging (Fig. 1). The photochemical efficiency clearly assigns the respective areas within the ears (indicated in the false-colour image as blue = low and red = high). Under optimal conditions, F_v/F_m of healthy undamaged plant parts can obtain a maximum of 0.84 (VON WILLERT, 1995). However, under the conditions of the experiments mean maximum photochemical efficiency of healthy control plants was 0.76 (Fig. 1, first row). The associated kernel-density-curve shows a clear and relatively narrow single peak of high F_v/F_m -values. At the beginning of the disease (up to 3% infection), the F_v/F_m -distribution still has one peak and reflects a high degree of efficiency, i.e. 99.87% of all F_v/F_m -values are in the range of 0.5 to 0.75.

With progressing infection, the distribution of F_v/F_m broadened. At a degree of infection of 20%, there were areas of highly reduced fluorescence indicating dead ears beside ears that are completely healthy and undamaged (Fig. 1, second row). Hence, the contribution of F_v/F_m in the range of 0 to 0.5 increased in the distribution plot. At the same time, the maximum F_v/F_m decreased to 0.71. This can be estimated from the considerable shift of the F_v/F_m -values.

A further clear shift to a two-peaked distribution pattern of the photochemical efficiency was visible at an infection rate of 50%. However,

only damaged or dead kernels had a very low F_v/F_m close to 0 (0-0.04). In contrast, the undamaged tissue retains high F_v/F_m -values in the range of 0.46 to 0.74 (Fig. 1, third row). This means that *Fusarium* does not only inhibit photosynthetic performance of infected kernels but causes irreversible damage to photosystem II, and the entire tissue. The progression of the disease is easily visible from both the false-colour images and the value-distribution. Completely dead ears again showed a one-peaked distribution curve (not shown), which now concentrated in the range of low F_v/F_m (0-0.2).

Very similar conclusions can be obtained by the analysis of the maximum yield of fluorescence (F_v/F_0). Hence, a pixel wise accumulation of F_v/F_m - and F_v/F_0 -values (from low to high) of the fluorescence images should allow the effective differentiation between healthy or weakly infected and strongly infected ears with many completely dead spikelets (Fig. 2). In a cumulative plot, F_v/F_m -values of plants with degrees of disease between 2 and 100% were classified in steps of 0.05 and cumulated accordingly. Indeed, both parameters showed similar curves at respective degrees of disease although F_v/F_m -values seemed to allow a slightly better differentiation. An optimal detection and distinction, respectively, of the disease was obtained with cumulative F_v/F_m -value of 0.3 (Fig. 2). Here, the SPEARMAN-correlation value between the degree of disease and single F_v/F_m -classes was 0.94. Hence, the threshold for the distinction of areas with damaged tissues was set at 0.3. The highest correlation with F_v/F_0 was found at 0.6.

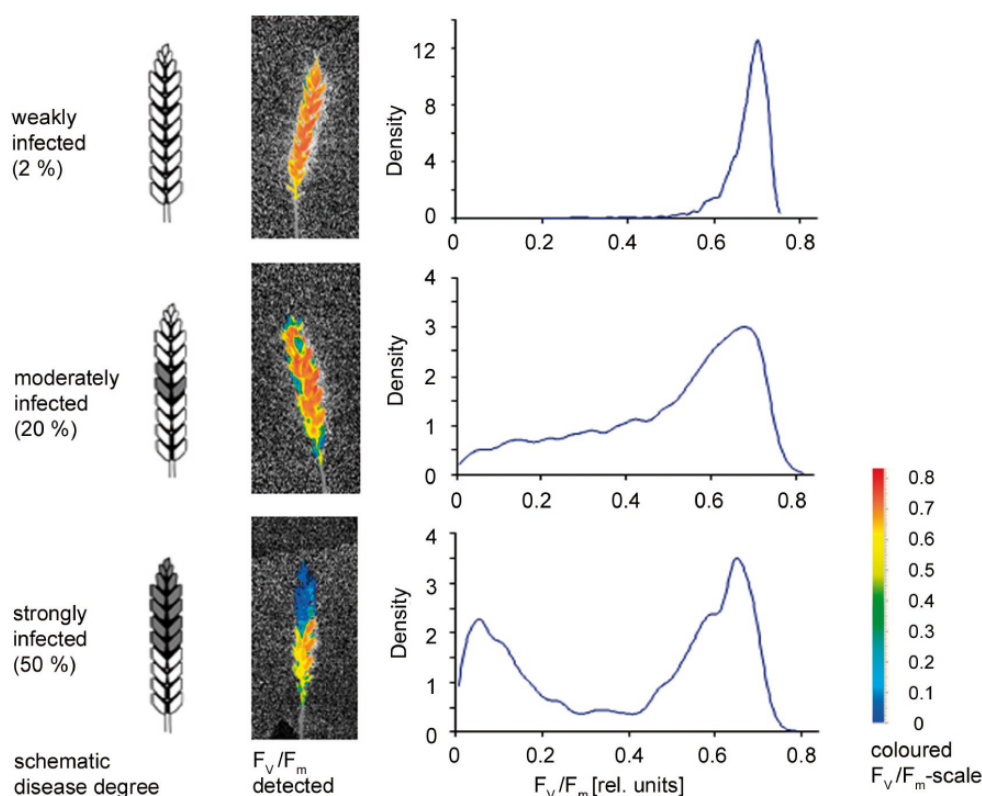


Fig. 1: Schematic depiction of different disease degrees (adapted from OLDENBURG, 2004) and the respective photochemical efficiency of a weakly, a moderately and a strongly infected ear: chlorophyll fluorescence images and density of F_v/F_m .

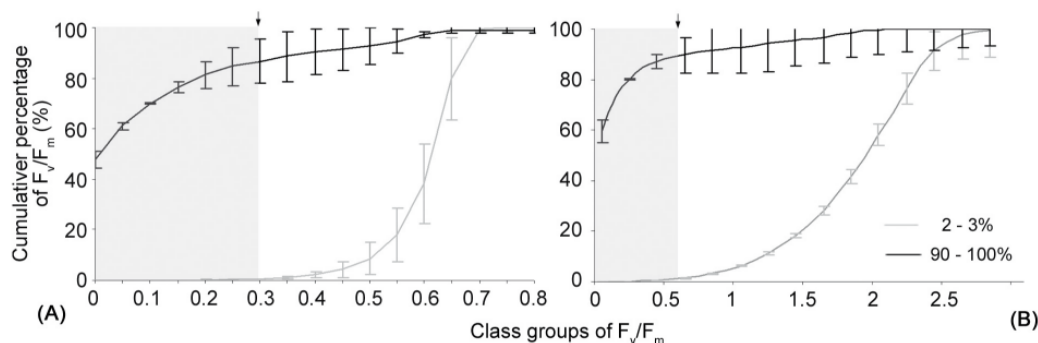


Fig. 2: Cumulative percentage of F_v/F_m (A) and F_v/F_0 (B) of wheat ears of different classes of disease degrees.

The analysis of the cumulative F_v/F_m at 0.3 of ears with different degree of disease indicated that wheat ears of lowest disease class (2-3% disease degree) showed only a very minor proportion (0.68%) of this low photochemical efficiency class (Fig. 3). The proportion increased to 10.4% in ears of 10-20% and to 33.0% in ears of 40-60% disease degree. This clearly points out that under these conditions the ears contain both fully active as well as totally inactive, damaged spikelets. In ears visually rated as nearly completely dead (>90% disease degree), on average 85% of the spikelets were identified as damaged.

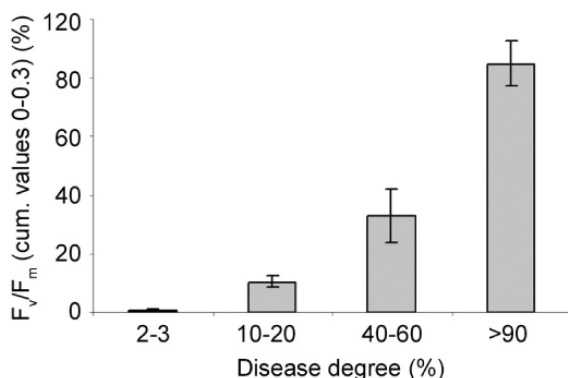


Fig. 3: Classes of cumulative values of F_v/F_m at 0.3 (%) at different degree of disease of the ears ($n=2-6$).

A plot of the degrees of infection, as rated according to WALTHER et al. (2000) and the proportion of cumulative values of F_v/F_m at 0.3 (Fig. 4) emphasises the close correlation between both parameters ($R^2 = 0.978$). This close correlation points out that the fluorescence parameter used may allow to successfully qualify and quantify infected ears. This interrelationship yielded the equation $y = 4.00256 + 1.0731529 \cdot x$. For a future application of the method of disease detection, the degree of infection y can be determined using the regression equation and the F_v/F_m -values (cumulative portion at 0.3) as x -values.

However, the plot also indicates that the assignment of a low degree of infection is hardly possible. Only above an infection threshold of 5%, the clear relationship allows a statistically sound interpretation. This is also indicated by a root mean square error (RMSE) of 5.32%. Hence, this approach may cause a slight over- and underestimation

of about 6%, respectively, of the infection. However, this interferes only in the low-infection classes and mostly at the very beginning of infection.

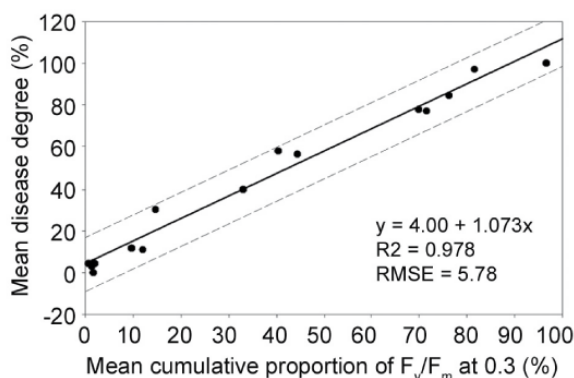


Fig. 4: Regression between mean cumulative proportion of F_v/F_m -values at 0.3 and mean degree of disease rated according to WALTHER et al. 2000 (15 ears, measured at 3 different dates).

Differentiation of the degree of disease during progressive infection

The measurements started one day after completion of inoculation. Ears with an infection larger than 5% on the 11th day after infection (dai) were classified as highly infected (Fig. 5, squares, $n = 4$). Two ears (black lines) were classified as weakly infected (Fig. 5, weak symptoms) while the controls (Fig. 5, diamonds, $n = 6$) were rated free of any infection.

Applying the cumulative portion of F_v/F_m -values at 0.3, it was successfully possible to identify diseased ears with a degree of infection of higher than 5% (Fig. 5). Ears with strong symptoms showed an average cumulative portion of F_v/F_m of 2.8%, even on the first day of measurement (6th dai). In contrast, weakly infected plants had a mean cumulative portion of F_v/F_m of 0.4%, and controls that of 0.2%. On the 11th dai, the average difference between controls and plants with strong symptoms increased to 7.4%. There were no differences between control and diseased plants at a degree of infection below 5%. The statistical examination by means of the WILCOXON-rank sum test showed that the class of the strong diseased ears significantly

differs from the control in all measurements ($p < 0.019$). A significant separation in the class of the weakly diseased ears could not be verified.

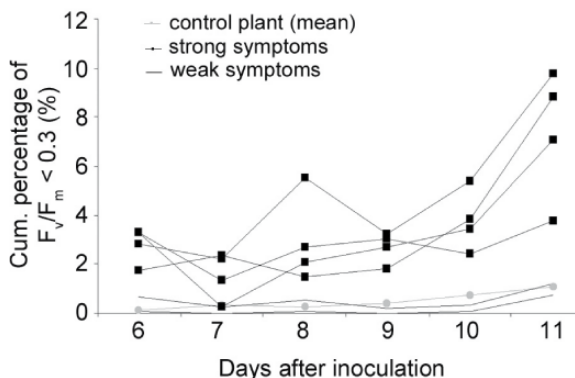


Fig. 5: Cumulative portion of F_v/F_m -values at 0.3 of controls (diamonds) and weakly (<5% disease degree, black lines) and strongly diseased plants (5-10% disease degree, squares) during progression of infection.

Effects of infection on yield and the mycotoxin content of grains

Grain yield

As expected, the mass of harvested grains was the lower the higher the degree of infection. Compared to ears of the low infection class (0-5%), grain mass was reduced by about one third (0.45 g to 0.3 g) in plants of the strongest-infection class. However, this difference was statistically not significant.

The grain mass of the control plants was nearly the same as that of the infection class 5-10% and therefore relatively low. This may be due to the fact that stronger plants of the cultivated batch were inoculated while the control included some weaker plants.

Proportion of sterile grains and grains infected with mycelium

Some flower primordia have been seriously affected by Fusarium infection resulting in sterile grains. Furthermore, some of the grains have also been coated with a pink-reddish mycelium. The proportion of the so called shrunk grains, i.e. the sterile grains and those covered with the reddish mycelium increased with the degree of disease. In the class of weakly diseased ears, the proportion of shrunk grains was approx. 10%, in the class of strongly diseased ears (20-30%) it was twice as high. As expected, control plants were completely free of symptoms. Furthermore, the number of spikelet per ear and the ear length did not show any differences between control and infected plants.

Tab. 1: DON-contents of grains from infected and control plants (control 2 was removed because of mildew infection).

Sample	Mean DON content ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
control	107
control	48
control	0
diseased, 0 - 5%	3583
diseased, 5 - 30%	> 6300

Contents of mycotoxin

In addition to external symptoms of head blight disease, the infected plants were also massively contaminated by DON. As expected, untreated control plants did not contain any DON or showed only a minimum and neglectable content of DON (Tab. 1). However, the artificially infected plants were highly contaminated with DON and considerably exceeded the limits legal in the EU ($1250 \mu\text{g kg}^{-1}$). Therefore, it could be verified that successful infection with *Fusarium* inevitably results in mycotoxin contamination. Hence, the results of the degree of infection obtained by CFI may be directly related to the mycotoxin content of the grains.

Discussion

Main *Fusarium* infection occurs via asco- and conidiospores, respectively, from mid ear/panicle emergence until end of flowering (OLDENBURG, 2004). Under humid conditions, ascospores and conidia rapidly propagate on the soil or on plant residues and may be spread over the leaves by plashing rain. From there they easily reach the ears' surface (OBST und GEHRING, 2002; OLDENBURG, 2004). The fungi gradually penetrate into the host's tissue and cells, block the vascular bundles, and disturb nutritional supply and metabolic processes (KANG and BUCHENAUER, 2000). This is accompanied by a complete loss of chlorophyll, which finally leads to a bleaching of the ears as typical for head blight. Besides, above the point of infection, grains often shrunk (OLDENBURG, 2004). Hence, *Fusarium*-caused head blight is characterised by the occurrence of both healthy and diseased spikelet within one ear but finally all grains of the ear may die (HEITEFUSS et al., 1993). The dynamics and the extent of damage development mainly depend on environmental conditions favouring fungi growth and on resistance capability of cereal cultivars.

Owing to this dynamic, disease evolution is highly reflected by an increasingly disturbed and inhibited photosynthetic activity of the individual spikelet. Therefore, chlorophyll fluorescence analysis may be a very helpful tool to non-invasively monitor infection development. However, conventional portable glass fibre fluorometers measure only an average chlorophyll fluorescence value on a distinct spot of the investigated objects. In a study on the recognition of tulip breaking virus (TBV) on three tulip cultivars with diverging colour patterns, POLDER et al. (2009) used the average F_v/F_m to identify the TBV-infection as accurately and as early as possible under laboratory conditions. The results of the average F_v/F_m differed by up to 46% from the disease degree rated by ELISA-tests. The authors referred this large disagreement to hail damages of the tulip leaves. However, it may also be due to the fact that averaging of the fluorescence parameter may level most disease-related differences.

Visual disease inspection is also an important source of uncertainty. POLDER et al. (2009) reported a deviation of visual rating results from those of the ELISA-test of up to 28%. In contrast, our rating errors were considerably less (9.6%). This higher accuracy may be due to the fact that rating of cereal is an often applied and evaluated method, quite in contrast to that of TBV-damaged coloured tulip leaves.

Instead of average chlorophyll fluorescence values spatial variability of disease development was analysed by using chlorophyll fluorescence images in the presented study. This approach allowed the evaluation of the changes of the infection pattern typical for head blight. During the course of disease development, increasing areas of the ears with dead spikelets and, hence, low F_v/F_m (<0.3), alternates with healthy spikelets showing high F_v/F_m (>0.3). Hence, the spatial distribution pattern, and not the average chlorophyll fluorescence, is used to estimate the disease degree (BAURIEGEL et al., 2009).

Recent literature (HÄUSER-HAHN, 2005; KUCKENBERG et al., 2007) let us assume that variations in photosynthetic activity and, concomitantly, in chlorophyll fluorescence may occur even in the early phase of infection. Therefore, a daily recording was chosen during

the first week after infection. However, the measurements revealed that early changes at cellular level had minor effects on PSII. Only if the integrity of the host plant's cellular structures was destroyed by fungal hyphae, the photosynthetic system was damaged. This interpretation agrees with the findings of KANG and BUCHENAUER (2000). By means of light and electron microscopy, these authors showed that cellular changes such as degeneration of cytoplasm and of cell organelles, the disintegration or digestion of cell walls and deposition of material on vessel walls of the diseased ears occurred only 4-5 d after infection.

The presented analysis indicate that infection by *Fusarium culmorum* on less resistant wheat cultivars did obviously not induce any defence reactions in the spikelet tissues, i.e. *Fusarium* fungi destroy their host perthophytically. In contrast, crown rust infection development on oat leaves (SCHOLLES and ROLFE, 1996) results in pronounced defence reactions including a short-term upregulation of photosynthetic activity and, hence, increase of F_m in „green islands“ immediately surrounding the area of sporulation. Nevertheless, BUCHENAUER and KANG (2002) suggest that high resistant wheat cultivars may have developed defence mechanisms against *Fusarium* at the cellular level, e.g. by the depositions of distinct cell wall materials and the formation of papillae.

The capability of chlorophyll fluorescence analyses or imaging to rapidly and precisely detect tissue infection in general strongly depends on the object investigated. Its effectiveness may also vary in time. As shown by MATOUŠ et al. (2006), *Pseudomonas syringae* on *Arabidopsis thaliana* is detectable within few hours after infection. In contrast, first symptoms of infection caused by *Venturia inaequalis* on apple seedling leaves can only be recognised 7 d after infection (FÖRSCHLER et al., 2003). Furthermore, identification of *Chrysomyxa rhododendri* evoked needle rust on Norway spruce seedlings by chlorophyll fluorescence analysis (BAUER et al., 2000) is only possible 3 weeks after infection.

Moreover, turnip mosaic virus infection of stem mustard did not at all affect the maximum photochemical efficiency of PSII (F_v/F_m) but slightly reduced non-photochemical quenching and increased the contribution of alternative electron sinks (GUO et al., 2005). The latter indicates an over-excitation of the photochemical systems, but surprisingly no obvious inhibition of photosynthetic competence occurred.

In wheat spikelets, HÄUSER-HAHN (2005) found no changes in the amount of chlorophyll after three days of *Fusarium* infection. Hence, early physiological effects of fungal infection include a decline in total photosynthetic activity and the maximum quantum efficiency of photosynthesis rather than a rapid degradation of photosystems as indicated by chlorophyll reduction.

In the present study, chlorophyll fluorescence analysis could clearly differentiate diseased and health ears after 5 dai. This nicely reflects the results of KANG and BUCHENAUER (2000), who identified *Fusarium* infection of spikelet tissue within 4 dai by means of microscopic analysis of cytological preparations. The short time gap of 1 to 2 d may be due to the time needed for the development of external fungi mycelia visible on the plant surface.

KUCKENBERG et al. (2007) proposed that in chlorophyll fluorescence imaging analyses, the F_v/F_0 ratio should yield more precise information about rust development of winter wheat leaves than the maximum photochemical efficiency F_v/F_m . In their study, F_v/F_0 declined 2 to 3 d before occurrence of any visual symptoms. However, in this present study no advantage of F_v/F_0 could be verified.

F_v/F_0 is assumed to reflect the maximal quantum yield of fluorescence (BUSCHMANN et al., 1999). Empirically it is rated as an indicator of PSII competence. This parameter has also been used to estimate the transportation of energy from PSII to PSI at 692nm and -196 °C. (KITAJIMA and BUTLER, 1975). However, no clear physiological meaning could be ascribed to F_v/F_0 up to now (MATOUŠ et al., 2006).

In contrast, F_v/F_m indicates the PSII photochemical efficiency by dark adapted plants with full open PSII-reaction centres (VON WILLERT et al., 1995; MAXWELL and JOHNSON, 2000) as early shown by KITAJIMA and BUTLER (1975).

Anyway, the presented study clearly indicated that important basic prerequisites for chlorophyll fluorescence measurements have to be observed to yield a close correlation between visual rating and F_v/F_m or F_v/F_0 , respectively. Both the chlorophyll fluorescence signal itself and photosynthesis are highly susceptible to variations in irradiation, e. g. by changes of the distance to light source, direct sun light or shadow effects. For meaningful maximum fluorescence signals, a complete uniform illumination of the object is particularly important. However, rating errors or bad edge regions recognition on infertile spike heads may further complicate the exact comparison.

Despite these problems, the presented approach should rapidly yield valuable information on the degree of *Fusarium* infection on wheat and hence on the risk of its mycotoxin contamination. On the other hand, it has been questioned that visual appearance of head blight always reflects detectable mycotoxin contents (MIEDANER and SCHNEIDER, 2002). In the present study, all infected ears had measured mycotoxin contents of almost three-fold (disease degree <5%) to more than six-folds (disease degree >30%), respectively, of the relevant EU-proposed threshold for DON (1250 µg kg⁻¹). Hence, it clearly exceeded the acceptable critical concentration, presumably non hazardous to health. It is still controversially discussed whether the fungal development directly or via yet un-identified toxic metabolic products released by the fungi may induce the dieback of plant tissue. Furthermore, it has not yet been proven, how far the production and the segregation of mycotoxins, respectively, can simultaneously damage the host tissue. It is clear, that DON mycotoxins and nivalenols inhibit the protein synthesis by binding to ribosomes (KANG and BUCHENAUER, 1999). It may be possible that DON and nivalenol can inhibit the defence responses of the host cell thus relieving the penetration of *Fusarium* hyphae (OBST and GEHRING, 2002).

On the other hand, MIEDANER and SCHNEIDER (2002) and BARTELS and RODEMANN (2003) assumed that the disease degree does not necessarily reflect a certain mycotoxin content because concentration of mycotoxin may be highly variable in response to various external factors. Nevertheless, under controlled conditions, a close correlation between mycotoxin content and the degree of disease as obtained by visual rating could always be obtained. Certainly, additional measurements will be necessary to confirm and reinforce the close correlation between mycotoxin content, degree of disease and the results of image analyses. The possibility of a direct inference from imaging to mycotoxin content would be an important progress for practical applications.

To conclude, by chlorophyll fluorescence imaging, it is possible to very early (from 6th dai) and also very exactly (10% RMSE) identify *Fusarium* infection on ears of winter wheat plants. The chlorophyll fluorescence parameter F_v/F_m proved to be a helpful indicator of the damage of photosynthetic activity caused by *Fusarium culmorum*. Nevertheless, for field application of this method, further investigations are necessary.

Acknowledgements

This project was funded by the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF 0339992, ProSenso.net²). Furthermore, the authors thank Dr. B. Rodemann of the Julius-Kühn-Institute, Braunschweig, for providing the plant material.

References

- BARTELS, G., RODEMANN, B., 2003: Strategien zur Vermeidung von Mykotoxinen im Getreide. *Ges. Pfl.* 55, 125-135.

- BAUER, H., PLATTNER, K., VOLGGER, W., 2000: Photosynthesis in Norway spruce seedlings infected by the needle rust *Chrysomyxa rhododendri*. *Tree Phys.* 20, 211-216.
- BAURIEGEL, E., BEUCHE, H., DAMMER, K.H., GIEBEL, A., HERPPICH, W.B., INTREB, J., RODEMANN, B., 2009: Detection of head blight (*Fusarium* spp.) at ears of winter wheat using hyperspectral and chlorophyll fluorescence imaging. In: van Henten, E.J., Goense, D., Lokhorst, C. (eds.), *Precision Agriculture '09. Proceedings of the Joint International Agricultural Conference*, 203-210. Academic Publishers, Wageningen.
- BRAVO, C., MOSHOU, D., OBERTE, R., WEST, J., MCCARTNEY, A., BODRIA, L., RAMON, H., 2004: Foliar disease detection in the field using optical sensor fusion. *Agricultural Engineering International: the CIGR Journal of scientific research and development. Manuscript FP 04 008*. Vol. 6.
- BUSCHMANN, C., BILKE, S., BUTTERER, A., ENK, A., LÄNGLE, T., WENZEL, O., LICHTENTHALER, H.K., 1999: Einfluß von Trockenstreß auf die Photosyntheseaktivität verschiedener Ökotypen der Buche (*Fagus sylvatica* L.) – Unterschiede in der Trockenstressempfindlichkeit. *Berichtsreihe zum Statusseminar der Baden-Württemberg-Projekträgerchaft „Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung“ (BW-PLUS), FZKA-BWPLUS 15, Diskussionskreis, Leopoldshafen*, 1-12.
- BUCHENAUER, H., KANG, Z., 2002: Cytologische Studien zur Infektion und Ausbreitung von Fusarien in Weizenähren sowie zu Abwehrreaktionen in Ähren resistenter und anfälliger Weizensorten. *Tagungsband der 13. Wissenschaftlichen Fachtagung der Landwirtschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Lehr- und Forschungsschwerpunkt „Umweltverträgliche und standortgerechte Landwirtschaft“: Fusariumbefall und Mykotoxinbelastung von Getreide – Ursachen, Auswirkungen, Vermeidungsstrategien*. Bonn, 2001, 45-54.
- CHAELE L., PINEDA, M., ROMERO-ARANDA, R., VAN DER STRAETEN, D., BARÓN, M., 2006: Robotized thermal and chlorophyll fluorescence imaging of pepper mild mottle virus infection in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell Physiol.* 47, 1323-1336.
- CHEN L.-S., PENGMIN, L., CHENG, L., 2009: Comparison of thermotolerance of sun-exposed peel and shaded peel of „Fuji“ apple. *Environ. Exp. Bot.* 66, 110-116.
- CHROPOVA, J., ŠÍP, V., SYKOROVÁ, S., SYCHROVÁ, E., MATĚJOVÁ, E., 2004: Beitrag zur Problematik der Ährenfusariosen bei Getreide. *J. Appl. Bot. Food Qual.* 78, 153-156.
- CURTUI, V.G., GAREIS, M., USLEBER, E., MARTLBAUER, E., 2001: Survey of Romanian slaughtered pigs for the occurrence of mycotoxins ochratoxins A and B and zearalenone. *Food Add. Contamin.* 18, 730-738.
- DALEY, P.F., 1995: Chlorophyll fluorescence analysis and imaging in plant stress and disease. *Can. J. Plant Path.* 17, 167-173.
- DEHNE, H.-W., OERKE, E.-C., STEINER, U., 2004: Auftreten von Mykotoxinen im Getreide und Vermeidungsstrategien aus Sicht des Pflanzenbaus. *Agrarspectrum* 37, 129-140.
- DELWICHE, S.R., 2003: Classification of scab- and other mold-damaged wheat kernels by near-infrared reflectance spectroscopy. *Trans. ASAE* 46, 731-738.
- DELWICHE, S.R., HARELAND, G.A., 2004: Detection of scab-damaged hard red spring wheat kernels by near-infrared reflectance. *Cereal Chem.* 81, 643-649.
- DLG-WORKING GROUP „Mykotoxine“, 2000: Mykotoxine vermeiden statt „bekämpfen“. Sonderdr. DLG-Mitt.8. Available at: <http://www.dlg.org/uploads/media/myko.pdf>
- FÖRSCHLER, A., PORTZ, C., STEINER, U., SCHMITZ-EIBERGER, M., NOGA, G., 2003: Minderung von pilzlichem Pathogenbefall im organischen Obstbau durch Zufuhr von Antioxidantien. *Landwirt. Fak. Univ. Bonn, Schriftenr. Lehr- u. Forschungsschwerpunktes USL*.
- FORSTREUTER, M., SCHRÖDER, R., HERPPICH, W.B., 2006: Chlorophyll-fluoreszenzbildanalyse zur raschen Indikation des Befalls von Laub- und Nadelbäumen durch herbivore Insekten. *Bornimer Agrartechnische Berichte* 56, 26-33.
- FRANKE, J., MENZ, G., OERKE, E.-C., RASCHER, U., 2005: Comparison of multi- and hyperspectral imaging data of leaf rust infected wheat plants. In: Owe, M., D'Urso, G. (eds.), *Remote sensing for agriculture, ecosystems and hydrology VII*, 349-359. *Proceeding of SPIE Vol.* 5976.
- GUO, D.-P., GUO, Y.-P., ZHAO, J.-P., LIU, H., PENG, Y., WANG, Q.-M., CHEN, J.-S., RAO, G.-Z., 2005: Photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence in leaves of stem mustard (*Brassica juncea* var. *tsatsai*) after turnip mosaic virus infection. *Plant Sci.* 168, 57-63.
- HÄUSER-HAHN, I., 2005: Focus on Fusarium at BCS research & development. Presentation at Fusariumsymposium Monheim. http://www.press.bayercropscience.com/bcsweb/cropprotection.nsf/id/FS05_FoconFusatBCSRD_EN. Accessed 20 January 2010.
- HEITFUSS, R., KÖNIG, K., OBST, A., RESCHKE, M., 1993: *Pflanzenkrankheiten und Schädlinge im Ackerbau*. DLG-Verlag, München.
- HERPPICH, W.B., 2002: Application potential of chlorophyll fluorescence imaging analysis in horticultural research. In: Zude, M., Herold, B., Geyer, M. (eds.), *Fruit, nut and vegetable production engineering*, 609-614. *Proceedings of the 6th International Symposium. Institut für Agrartechnik Bornim e.V., Potsdam*.
- HERPPICH, W.B., LINKE, M., LANDAHL, S., GZIK, A., 2001: Preharvest and postharvest responses of radish to reduced water supply during growth. *Acta Hort.* 553, 89-90.
- KANG, Z., BUCHENAUER, H., 1999: Immunocytochemical localization of fusarium toxins in infected wheat spikes by *Fusarium culmorum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55, 275-288.
- HOFF, M., 2003: Charakterisierung des Schimmelpilzes *Fusarium culmorum* als Allergenträger. *ibidem-Verlag*, Stuttgart.
- KANG, Z., BUCHENAUER, H., 2000: Cytology and ultrastructure of the infection of wheat spikes by *Fusarium culmorum*. *Mycol. Res.* 104, 1083-1093.
- KITAJIMA, M., BUTLER, W.L., 1975: Excitation spectra for photosystem-I and photosystem-II in chloroplasts and spectral characteristics of distribution of quanta between 2 photosystems. *Biochim. Biophys. Acta* 408, 297-305.
- KLUGE, A., NORDMEYER, H., 2009: Automated weed detection in winter wheat by using artificial neural networks. In: van Henten, E.J., Goense, D., Lokhorst, C. (eds.), *Precision Agriculture '09. Proceedings of the Joint International Agricultural Conference*, 203-210. Academic Publishers, Wageningen.
- KUCKENBERG, J., TARTACHNYK, I., SCHMITZ-EIBERGER, M., NOGA, G., 2007: Early detection of leaf rust and powdery mildew infections on wheat leaves by PAM fluorescence imaging. *Precis. Agric.* 8, 515-521.
- LEONARD, K.J., BUSHNELL, W.R. (eds.), 2003: *Fusarium head blight of wheat and barley*. St. Paul Minn., APS Press.
- LIENEMANN, K., MEIER, A., OERKE, E.-C., STEINER, U., DEHNE, H.-W., 2002: Control of Fusarium head blight in wheat. In: Russel, P.E., Dehne, H.-W. (eds.), *Modern fungicides and anti-fungal compounds*, 253-261. 13th International Symposium, 13-17 May, 2001, Castle of Reinhardtsbrunn/Friedrichroda, Germany.
- LORENZEN, B., JENSEN, A., 1989: Changes in leaf spectral properties induced in barley by cereal powdery mildew. *Remote Sens. Environ.* 27, 201-209.
- MATOUŠ, K., BENEDIKTOVÁ, Z., BERGER, S., ROITSCH, T., NEDBAL, L., 2006: Case study of combinatorial imaging: What protocol and what chlorophyll fluorescence image to use when visualizing infection of *Arabidopsis thaliana* by *Pseudomonas syringae*? *Photosynth. Res.* 90, 243-253.
- MAXWELL, K., JOHNSON, G.N., 2000: Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51, 659-668.
- MIEDANER, T., SCHNEIDER, B., 2002: Züchtungsstrategien zur Verringerung von Ährenfusariosen und Mykotoxingehalten bei Getreide. *Tagungsband der 13. Wissenschaftlichen Fachtagung der Landwirtschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Lehr- und Forschungsschwerpunkt „Umweltverträgliche und standortgerechte Landwirtschaft“: Fusariumbefall und Mykotoxinbelastung von Getreide – Ursachen, Auswirkungen, Vermeidungsstrategien*. Bonn, 2001, 55-67.
- NEUNER, G., BUCHNER, O., 1999: Assessment of foliar frost damage: a comparison of in vivo chlorophyll fluorescence with other viability tests. *J. Appl. Bot.* 73, 50-54.

- NEDBAL, L., SOUKUPOVA, J., WHITMARSH, J., TRTILEK, M., 2000a: Postharvest imaging of chlorophyll fluorescence from lemons can be used to predict fruit quality. *Photosynthetica* 38, 571-579.
- NEDBAL, L., TRTILEK, M., HERPPICH, W.B., 2000b: Methods and equipment for fluorescence imaging on plant material. *Bornimer Agrartechnische Berichte* 25, 127-135.
- OBST, A., GEHRING, K., 2002: Getreide. Krankheiten, Schädlinge, Unkräuter. Verlag Th. Mann, Gelsenkirchen-Buer.
- OLDENBURG, E., 2004: Crop cultivation measures to reduce mycotoxin contamination in cereals. *J. Appl. Bot. Food Qual.*, 174-177.
- Ordinance (EG) Nr. 856/2005 in the European Union, 2005. Available at: http://www.lgl.bayern.de/lebensmittel/rueckstaende/mykotoxine_hoehchstmenngenregelung.htm#verordnungen. Accessed 7 January 2009.
- POLDER, G., VAN DER HEIJDEN, G.W.A.M., VAN DOORN, J., VAN DER SCHOOR, R., BALTISSEN, A.H.M.C., 2009: Detection of the tulip breaking virus (TBV) in tulip using spectral and vision sensors. In: van Henten, E.J., Goense, D., Lokhorst, C. (eds.), *Precision Agriculture '09*. Proceedings of the Joint International Agricultural Conference, 219-227. Academic Publishers, Wageningen.
- RAGAB, W.S.M., DRUSCH, S., KUHLMANN, A., BEYER, M., 2005: Characterizing effects of fermentation and baking on the deoxynivalenol content of rolls. *J. Appl. Bot. Food Qual.* 79, 197-201.
- SCHOLES, J.D., ROLFE, S.A., 1996: Photosynthesis in localised regions of oat leaves infected with crown rust (*Puccinia coronata*): quantitative imaging of chlorophyll fluorescence. *Planta* 199, 573-582.
- SCHLÜTER, K., KROPF, U., KARLOVSKY, P., 2006: Untersuchungen zur systemischen Infektion von *Fusarium culmorum* an Winterweizen in Schleswig-Holstein. *Ges. Pfl.* 2, 107-116.
- SINGH, C.B., JAYAS, D.S., PALIWAL, J., WHITE, N.D.G., 2007: Fungal detection in wheat using near-infrared hyperspectral imaging. *Trans. ASABE* 50, 2171-2176.
- TARTACHNYK, I., RADEMACHER, I., 2003: Estimation of nitrogen deficiency of sugar beet and wheat using parameters of laser induced and pulse amplitude modulated chlorophyll fluorescence. *J. Appl. Bot.* 77, 61-67.
- THATE, A., SCHUMANN, S., HANSCHMANN, G., URBAN, Y., 2008: Auftreten von Ährenfusariosen und Mykotoxinen in Sachsen und Ergebnisse der Vor- und Nachernteuntersuchungen von Winterweizen 2007. *Nachrichtenblatt Deutscher Pflanzenschutzdienst* 60.
- VON WILLERT, D.J., MATYSSEK, R., HERPPICH, W.B., 1995: *Experimentelle Pflanzenökologie, Grundlagen und Anwendungen*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- WALTHER, U., FLATH, K., MOLL, E., PROCHNOW, J., SACHS, E., 2000: Methodische Anleitung zur Bewertung der partiellen Resistenz von Sorten bzw. Linien unter Berücksichtigung epidemiologischer Aspekte. *Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft* 374, 9-25.

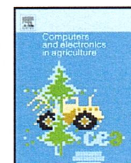
Address of the authors:

E. Bauriegel, W.B. Herppich, A. Giebel, Leibniz Institute for Agricultural Engineering Potsdam-Bornim, Max-Eyth-Allee 100, D-14469 Potsdam, Germany

3.2 Early detection of *Fusarium* infection in wheat using hyper-spectral imaging

Dieser Artikel beschreibt die Erkennung der Fusariumerkrankung an Winterweizen mittels der hyperspektralen Bildanalyse. Die Notwendigkeit eines schnellen Analyseansatzes bestand und diese Herausforderung wurde gelöst, indem für die Erkrankung spezifische Spektrenbereiche evaluiert und in einem neu erstellten head-blight-Index verrechnet wurden. Bestehende bildanalytische Auswertemethoden wie der `Spectral Angle Mapper` wurden mit dem neu definierten head-blight-Index verglichen.

BAURIEGEL, E., GIEBEL, A., GEYER, M., SCHMIDT, U., HERPPICH, W. B. (2011): Early detection of *Fusarium* infection in wheat using hyper-spectral imaging. Computers and Electronics in Agriculture 75, 304–312.



Early detection of *Fusarium* infection in wheat using hyper-spectral imaging

E. Bauriegel^{a,*}, A. Giebel^a, M. Geyer^b, U. Schmidt^c, W.B. Herppich^b

^a Leibniz-Institute for Agricultural Engineering Potsdam-Bornim, Dept. Engineering for Crop Production, D-14469 Potsdam, Germany

^b Leibniz-Institute for Agricultural Engineering Potsdam-Bornim, Dept. Horticultural Engineering, D-14469 Potsdam, Germany

^c Humboldt University Berlin, Faculty of Agriculture and Horticulture, Dept. Biosystems Engineering, D-14195 Berlin, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 July 2010

Received in revised form

30 November 2010

Accepted 10 December 2010

Keywords:

Fusarium culmorum

Head blight index

Plant disease

Non-invasive technique

Principal component analysis

Spectral Angle Mapper

ABSTRACT

Infections of wheat, rye, oat and barley by *Fusarium* ssp. are serious problems worldwide due to the mycotoxins, potentially produced by the fungi. In 2005, limit values were issued by the EU commission to avoid health risks by mycotoxins, both for humans and animals. This increased the need to develop tools for early detection of infections. Occurrence of *Fusarium*-caused head blight disease can be detected by spectral analysis (400–1000 nm) before harvest. With this information, farmers could recognize *Fusarium* contaminations. They could, therefore, harvest the grains separately and supply it to other utilizations, if applicable. In the present study, wheat plants were analyzed using a hyper-spectral imaging system under laboratory conditions. Principal component analysis (PCA) was applied to differentiate spectra of diseased and healthy ear tissues in the wavelength ranges of 500–533 nm, 560–675 nm, 682–733 nm and 927–931 nm, respectively. Head blight could be successfully recognized during the development stages (BBCH-stages) 71–85. However, the best time for disease determination was at the beginning of medium milk stage (BBCH 75). Just after start of flowering (BBCH 65) and, again, in the fully ripe stage (BBCH 89), distinction by spectral analysis is impossible. With the imaging analysis method ‘Spectral Angle Mapper’ (SAM) the degree of disease was correctly classified (87%) considering an error of visual rating of 10%. However, SAM is time-consuming. It involves both the analysis of all spectral bands and the setup of reference spectra for classification. The application of specific spectral sub-ranges is a very promising alternative. The derived head blight index (HBI), which uses spectral differences in the ranges of 665–675 nm and 550–560 nm, can be a suitable outdoor classification method for the recognition of head blight. In these experiments, mean hit rates were 67% during the whole study period (BBCH 65–89). However, if only the optimal classification time is considered, the accuracy of detection can be largely increased.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Fusarium infections often cause serious problems in wheat, rye, barley and oat production. It may rapidly result in very high crop losses and quality reductions (Johnson et al., 2005; Leonard and Bushnell, 2005) because affected grains are small, of low mass, and shrunken (Delwiche, 2003). Moreover, mycotoxins, potentially generated by these fungi, are poisonous and harmful both in human and animal nutrition (McCormick, 2005). Hence, infected and healthy grains should best be completely separated at harvest. If the symptoms of this *Fusarium* head blight disease could be early detected, at least prior to harvest, the farmers would indeed be able to harvest the infected grains isolatedly and utilize it for energy generation in biogas plants or combustors, if necessary. Furthermore, expensive and time-consuming serological analysis to determine

the actual mycotoxin contents (DON, zearalenone, fumonisin) of grains could be restricted to head blight-infected batches only.

The appearance of *Fusarium*-infected ears and plants, respectively, largely changes during the development of this disease, mostly due to degradation of chlorophyll contents and pronounced water losses. Hence, these changes lead to pronounced variations in spectral properties of infected grains and total ears. Thus, spectral analysis and, especially, spectral imaging should be suitable for the detection of head blight (Laguette et al., 2004).

Indeed, spectral analysis is relatively easy to apply, it is a non-invasive method, and it does not require further operations (Benito et al., 2008; Sankaran et al., 2010). Since long, it has e.g. been used for the analysis of the physiological status of plants and for the determination of chlorophyll and carotenoids contents in leaves (Lichtenthaler et al., 1996a,b; Merzlyak et al., 2008; Peguero-Pina et al., 2008). Furthermore, it reflects changes in the contents and the relative proportions of other quality-relevant compounds of the crops investigated (Merzlyak et al., 2005; Solovchenko et al., 2005; Benito et al., 2008). Consequently, excitation light sources for spec-

* Corresponding author. Tel.: +49 331 5699414.

E-mail address: ebauriegel@atb-potsdam.de (E. Bauriegel).

tral analyses and the expected relevant ranges of emission spectra vary in dependence of the desired application. Practical implementation spectral analyses may include determination of fruits and vegetables quality (Polder et al., 2002; Wulf et al., 2008), estimation of nitrogen supply or nutritional status of crop plants (Li et al., 2010; Fitzgerald et al., 2010; Yang et al., 2010) or the degree of peat decomposition (Bauriegel et al., 2008). Furthermore, spectral analysis is also commonly applied in remote sensing (Becker et al., 2007).

In addition, utilization of spectral analysis for detection of fungal and bacterial diseases is currently extensively under investigation (Pozdnyakova et al., 2002; Bauriegel et al., 2010; Sankaran et al., 2010; Williams et al., 2010). Both fungi and bacteria usually cause damages at molecular, cellular and/or tissue levels, which, in turn, can be detected as changes in the spectral signatures (Kang and Buchenauer, 2000; West et al., 2003). Modern, high resolution imaging such as videography and digital image analysis at various spectral ranges facilitate the detection of different plant diseases (Nilsson, 1995).

Certainly, the information about the spatial distribution of the variation in spectral signatures is a great advantage of spectral imaging. Local variations in the disease-induced physiological modifications of the plant tissues may help to early identify the development of the infection (Nicotra et al., 2003; Polder et al., 2005; Rascher et al., 2005). For instance, Muhammed and Larsolle (2003) found distinct changes in the visible (VIS) and near infrared (NIR) range in spring wheat leaves infected with *Drechslera tritici-repentis*. Furthermore, three *Puccinia* rust species could be determined by image analyses of different visible and near infrared wavelength ranges in wheat leaves (Devadas et al., 2009). In their analysis, the authors also compared the effectiveness of various spectral indices.

On the other hand, Franke et al. (2005) stressed that hyper-spectral imaging provided considerable advantages over multispectral approaches for the detection of leaf rust. The combination of spectral and spatial information provided by image analysis facilitates detection of plant diseases and infection-related damages in crops (Nilsson, 1995). Furthermore, Bravo et al. (2004) indicated that a combination of hyper-spectral and fluorescence image analysis could detect yellow rust on winter wheat with a very high accuracy of only 5–6% error rate.

In regard to *Fusarium* infections on grains, Wiwart et al. (2001) found a high correlation between the hue saturation intensity (HSI) color components of RGB images and the disease-reduced thousand seed mass of healthy and infected wheat. With this approach, the authors could distinguish diseased and healthy tissues with 90% probability in laboratory experiments. Under semi-practical conditions, the model-based statistical analysis of NIR spectra allowed separation of mold-damaged wheat kernels with an accuracy of 95% (Delwiche, 2003).

Peiris et al. (2009) and Dowell et al. (1999) successfully applied spectral analyses in the NIR range to determine the DON content of *Fusarium*-infected grains. In addition, Polder et al. (2005) concomitantly analyzed spectral information of transmission spectral imaging in both VIS and NIR range and *Fusarium culmorum* DNA-content by PLS.

Up to now, research on *Fusarium* infection was mainly focused on very basic approaches to detect this fungal disease in cereal kernels. However, for practical applications, it is essential to identify head blight disease at a very early stage of its development. Only this gives a realistic chance to successfully solve this important economic and food safety-relevant problem in the entire crop production chain. Early analysis of potential crop infection by spectral imaging may, indeed, provide the means to fulfill these demands. However, appropriate detection solutions for the practical application of spectral imaging on infected ears in the field are still missing.

Hence, applying hyper-spectral imaging on healthy and *Fusarium*-infected wheat plants, the objectives of the laboratory study were (1) to determine the wavelength ranges most appropriate for discrimination of head blight, (2) to find out the stage of grain development optimal for disease detection and (3) to elaborate a new straightforward classification method applicable under semi-practical conditions. Furthermore, it will be evaluated, how accurate spectra of diseased and healthy ears could be separated at different stages of grain development.

2. Material and methods

2.1. Plant material

For the first laboratory experiment, wheat plants (cv. 'Tai-fun') were grown under controlled conditions in a greenhouse in pots (0.18 m × 0.18 m, 16 grains each pot, 4 pots each per control and inoculated samples). Plants were artificially inoculated with a mixture of pathogens of the strain *F. culmorum* with a spore concentration of 250,000 spores ml⁻¹ on three successive days from the beginning of flowering. To ensure the success of the inoculation, plants were kept at 20 ± 2 °C, high humidity (70%) and illuminated for 12 h d⁻¹ (high-pressure sodium-vapor lamps, SON-T Plus 400W, Philips GmbH, Hamburg, Germany). Minor thrips infestation and sporadically appearing of mildew were tolerated and not treated with pesticides. Every second week the plants were fertilized with a 1% Combiflor (ADB Coswig, Coswig, Germany) fertilizer solution.

In the field experiment, plants of a cultivar-resistance-experiment at the Julius-Kuehn-Institute, Braunschweig (Germany) were used, which showed typical symptoms of head blight after a fivefold artificial spray infection with 50,000 spores ml⁻¹ of the strain *F. culmorum*. Inoculation took place with a Rau field sprayer (Kverneland Group Deutschland GmbH, Soest, Germany; spraying width 24 m) every second day after BBCH stage 61.

2.2. Experimental and measuring procedure

For spectral measurements, plants were placed in front of the hyper-spectral system at 0.5 m distance. The ears were fixed to a black background to record them uncovered and free of vibration. Immediately after inoculation (BBCH stage 65), measurements were recorded three times a week until ripeness (BBCH stage 89). Developmental stages of ears were graded according to the BBCH scale (Lancashire et al., 1991). The BBCH scale describes phenological growth stages, starting from dry seeds (BBCH 00) and ending with the harvest product (BBCH 99). Additionally, digital photos were taken to document progress of disease. Using sample pictures of infected ears (Walther et al., 2000), percentage infection of blighted spikelets per ear was estimated. The infection was estimated in steps of 1%, 2%, 3%, 5%, and between 10% and 100%, in 10%-steps. As a unit of visual rating of head blight disease pattern, the 'degree of disease' was defined.

2.3. Hyper-spectral measurement system

In the laboratory, reflection spectra were recorded in the wavelength range of 400–1000 nm with a self-built hyper-spectral camera system consisting of a spectrograph (ImSpector V10E, Specim Inc., Oulu, Finland), a monochrome camera (Pixelfly qe, PCO, Kelheim, Germany), a rotation mirror (adjustable with a microstep motor) and the software HyBiS 1.0. HyBiS 1.0, which was developed using LabView 8.2 (National Instruments, Austin, TX), controls

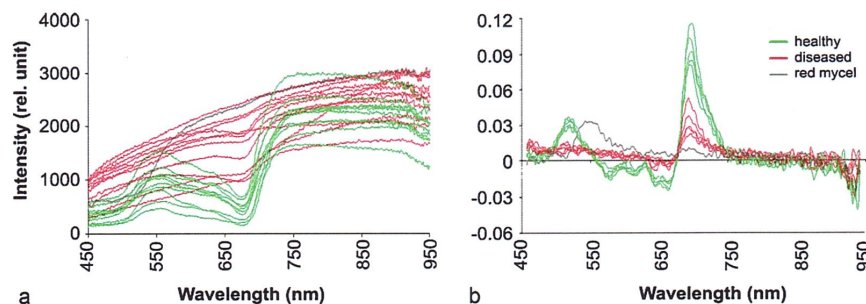


Fig. 1. Original spectra (a) and their smoothed 1st derivative (b) of healthy (light grey/green lines) and diseased (black/red lines) tissue areas. The spectrum depicted in the dark grey line is that of a red mycelium layer. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

the camera system and pre-processes the data including the b&w-adjustment of the spectra. The samples were illuminated by a stabilized halogen lamp (3900 Smart-Lite, 150W with 9155 CL Lightlines, 16" line light, Zeutec Opto-Elektronik GmbH, Rendsburg, Germany). Raw images were taken line by line with a spectral resolution of 2.5 nm.

In a first conversion step, the information was transformed to yield a cube containing the spatial information in the x–y-direction and the spectral information in z-direction with a band width of 1.2 nm. With each measurement, images for the black and the white adjustment were recorded. In the following conversion of the hyper-spectral-images into the byte stream format, the b&w-adjustment was performed. As 16 bit unsigned integer image cubes of $696 \times 512 \times 512$ pixel, each individual scan resulted in a 360 MB file.

2.4. Data analysis

Records were further analyzed with the software ENVI (ITT Visual Information Solutions, Boulder, USA). With this software, diseased and healthy areas of the ear could easily be distinguished in a false color image at 450 nm, 550 nm and 650 nm, by visual inspection. The false color images also facilitated the proper manual setting of ROIs and the selection of tissues for spectral analysis. Single hyperspectral images were used as training images to set the data base for classification and the principle component analyses (PCA). These images were excluded from later evaluation. In all hyperspectral images, spectra of healthy and diseased tissue areas were obtained pixel-wise and stored in a spectral library. Spectra of plants of both laboratory and field experiment were analyzed to consider the variability of plants (Fig. 1a).

In initial experiments, the wavelength ranges, most appropriate for discrimination of head blight (question 1) were determined. To cover a reasonable selection of infection appearance, both field-grown and laboratory-cultivated plants at the BBCH 75 were used for this purpose. From randomly selected ears, 104 spectra of individual distinctly healthy and diseased spikelets were chosen. The total subset is composed as shown in Table 1.

For the evaluation of the optimal stage of grain development for precise disease detection (question 2), 292 spectra of diseased and 80 spectra of healthy tissue areas were analyzed during the course

of the time series experiments. For each of the eight sampling days (ranging from BBCH 65 to BBCH 89), healthy and diseased spikelets were identified as described above; and their spectra were evaluated separately. At the first measurement day, no chlorophyll defect was visible on inoculated ears; hence, later diseased regions were analyzed. The relatively small number of spectra of healthy spikelet was sufficient because the variation of their spectral distribution was rather low (data not shown).

The spectra were smoothed in SAS 9.13 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) with the 'proc expand' function. This means, the spectra were compressed by the factor 1:3 (i.e. every fourth wavelength was chosen) and thinned (i.e. missing wavelength were spline-interpolated; factor 3:1). Afterwards, a centered moving-average smoothing over 11 values was applied. Finally, spectra were corrected according to the formula:

$$\frac{x_{ij}}{\sum_j(x_{ij})}, \text{ with } j \text{ as the } j\text{th spectrum and } i \text{ as the } i\text{th wavelength.}$$

Subsequently, first derivative was calculated with SAS to analyze differences in the entire spectral signature of healthy and diseased tissues on hand of specific changes in the slope of the spectral curves (Fig. 1b).

ROIs, manually set in training images, taken at the time of most pronounced occurrence of disease symptoms in BBCH 75, were the basis for the classification of validation images in ENVI. Spectral Angle Mapper (SAM; Yuhas et al., 1992; Kruse et al., 1993) was applied as classification method. SAM is based on the calculation of spectral similarities in n -dimensional feature spaces, determined by n spectral channels. The procedure compares the image spectra, which should be classified with a reference spectrum and, thus, defines a class assignment according to the respective similarities. The difference between spectra can be described by the angle, covered between their associated vectors (ENVI, 2010). In the present study, the maximum angle threshold was set to 0.1.

For the classification with the head blight index, spectral subsets in the ranges of 550–560 nm and 665–675 nm were established. Applying the 'band math'-function of ENVI, the respective spectral differences were calculated for both ranges. With the setting of a threshold, all pixels were assigned to one of the three object classes, diseased, healthy, and background. The relative proportion of the pixels classified as diseased, compared to the sum of healthy and diseased pixels, denoted the degree of disease.

In addition, the application of NDVI, greenness-band ($G = R_{554}/R_{677}$, Zarco-Tejada et al., 2005), structure intensive pigment index ($SPI = (R_{800} - R_{450})/(R_{800} + R_{650})$), Peñuelas et al., 1995), normalised pigment chlorophyll index ($NPCI = (R_{680} - R_{430})/(R_{680} + R_{430})$, Peñuelas et al., 1994) and Lichtenthaler's indices ($Lic1 = (R_{800} - R_{680})/(R_{800} + R_{680})$ and $Lic2 = R_{440}/R_{690}$, Lichtenthaler et al., 1996a,b) was tested on selected hyper-spectral images in ENVI.

Table 1
Data basis for the detection of the relevant wavelength ranges.

	Outdoor cultivar 1	Outdoor cultivar 2	Laboratory, 'Taifun'	Total
Healthy	20	20	8	48
Diseased	15	23	18	56

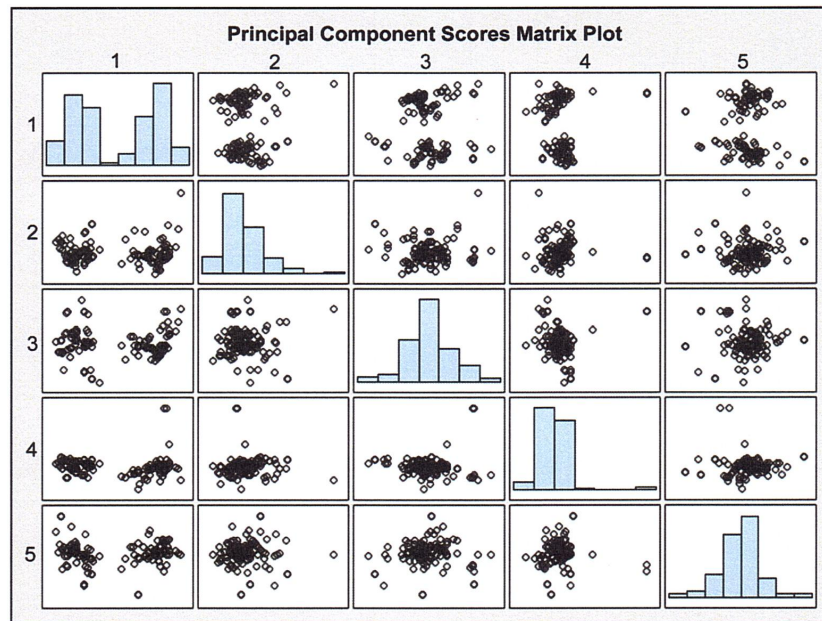


Fig. 2. Basic analysis of components as matrix plot.

3. Results

3.1. Determination of wavelength ranges, relevant for discrimination of head blight

Evaluation of the 104 individual spectra, given in Table 1, yielded typical mean spectra for healthy and diseased tissue areas (Fig. 1a). Due to the high chlorophyll content of healthy tissues, their spectra are characterized by a pronounced reflection minimum in the range between 670 and 700 nm, corresponding to the red chlorophyll absorption band.

Reflection signals vary between 5 and 50% in the range of 680–730 nm. Reduction of chlorophyll content shifted the inflection point to lower wavelength. This can easily be seen in case of highly infected diseased tissues, which, in contrast to healthy plants, also show an increased reflection in the range of the chlorophyll absorption band.

Red fungus mycelia, which rarely occur on the surface of the diseased ears, were indicated by a very distinct spectral pattern (Fig. 1, single dark grey line). This spectrum does not show any intensity drop in the red edge window (680–730 nm), because here the chlorophyll has been fully decomposed.

After smoothing and calculation of first derivative (Fig. 1b; cf. Section 2), all 104 individual spectra were subjected to a principal component analysis (PCA) to evaluate the wavelengths relevant for distinction of healthy and head blight-infected tissues. Out of a predetermined maximum of five main components, the first (PC1) nicely separated healthy and diseased objects and interprets 50% of the variances of data (Fig. 2). This comparatively low conformance resulted from a strong scattering above 750 nm. In general, the spectral range above 750 nm was not relevant for disease detection. Nevertheless, effective separation of spectra of healthy (Fig. 2, column 1, left group and dotted cloud) and diseased ear areas (Fig. 2, column 1, right group or dotted cloud) can be performed by PC1. Spectra of red mycelia

are situated on the right side in the group of diseased tissues.

Accepting only factor loadings above 0.8 in PC1, the wavelength ranges of 500–533 nm, 560–675 nm and 682–733 nm could be identified for their high potential to distinguish healthy and diseased ear areas (Fig. 3). Between 927 nm and 931 nm the camera sensor of the hyper-spectral imaging system was not sufficiently sensitive and, hence, the separation was uncertain in this range.

The components found in the PCA were used for discriminant analyses to evaluate the quality of the separation between healthy and diseased plant areas. Spectra were analyzed by means of cross validation. 100% of the areas of healthy ears and 94% of that of diseased ears could be accurately classified. It should be stressed that the red fungus mycelia on the surface of the dead ears was assigned to the diseased tissue areas. However, stunted ears or developmental disorders of ears, which often occurred under laboratory conditions, were incorrectly classified.

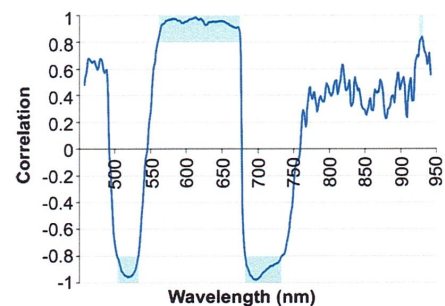


Fig. 3. Factor loadings of main component 1 in the range between 450 nm and 950 nm.

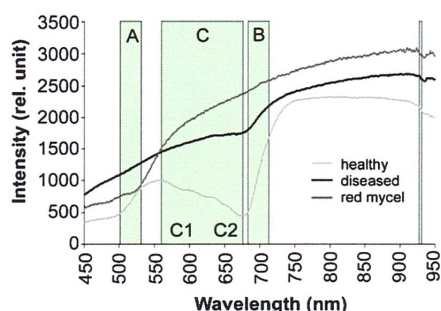


Fig. 4. Mean spectra of healthy (light grey line), diseased (black line) tissues and tissues covered with mycelia (dark grey line). Areas A, B and C were classified as relevant by PCA. For the classification applying the head blight index (HBI), especially area C with starting point C1 and endpoint C2 was chosen.

3.2. Application of relevant wavelength ranges for the discrimination of head blight

3.2.1. Definition of a head blight specific index

For outdoor detection of head blight, a simple and rapid system is needed. The application of well-known spectral indices such as NDVI, greenness-band, SIPI, NPCI, or Lic1 and Lic2, as tested in this study, did not yield meaningful classification results.

One solution might be a multispectral camera with specific filters. To simulate a technically realistic system, the most effective wavelength ranges (A, B and C, Fig. 4) were considered to create the following classification algorithm. For rapid classification, a low number of spectral ranges is still indispensable. Hence, only those two ranges were chosen that showed the highest inclination in the progression of the spectral curve. In the wavelength range of 570–680 nm (area C), the spectral signal decreased in healthy plants but increased in diseased plants. To facilitate the algorithm, the calculation was based on the starting and endpoints of the ranges (± 5 nm each). Out of the many alternative calculations, this index, henceforth referred to as **head blight index (HBI)**, seems to be most promising.

To generate the head blight index, the difference of the starting point C1 (550–560 nm) and the endpoint C2 (665–675 nm) were calculated. Using the index, ears infected with head blight were accurately separated from both healthy ears and from the background. All background pixels have a grey-scale value of approximately 0. Healthy areas show grey-scale values of <0 , in contrast, diseased tissue areas appear white and differ from the background as well as from the healthy tissue areas with a grey-scale value above 0. Thus, all diseased areas were identified at a grey-scale value higher than 0 (Fig. 5). A threshold was set at >500

to eliminate smaller incorrectly classified pixels. The background was defined in a threshold range of -500 to 500 .

Fig. 6 shows an example of the classification of diseased ears using HBI. The rated average degree of infection of this image was 52.5%, the degree determined with the head blight index was 37.1%.

Evaluating all images, the rated degrees of infection of head blight until 18 days after inoculation (dai) (BBCH 79/81) were accurately determined or slightly overrated (Fig. 7). From dai 21 (BBCH 81/85) on, head blight was slightly underestimated by classification, and it differed more than 20% on two successive days.

Classification of controls generally gave very good results. Here, a maximum of 2% was rated as diseased, which closely reflected reality. The controls partly showed slight developmental disorders.

One major aim of this analysis was to get as close as possible to the very good classification results obtained by Bauriegel et al. (2009) with the SAM (Spectral Angle Mapper) classification algorithm but applying a faster algorithm also suitable for field conditions. SAM considers 512 bands in the whole spectral range (400–1000 nm), including the very noisy region above 750 nm. In contrast, HBI incorporates a spectral range of only 17 bands (665–675 nm and 550–560 nm), in total, as basis for calculations.

In Fig. 8 the visually rated degrees of infection and those classified with HBI and SAM, respectively, are shown for two test series. Calculation of the residua was used to determine the quality of classification with both methods. 84% (HBI method) and 91% (SAM method) are in the range of a tolerance of $\pm 10\%$. The largest tolerances appeared among degrees of infection above 50%, where infection was generally underrated.

3.2.2. Reduction of classification effort with an existing SAM classification algorithm

Although it might be technically possible to record all 512 wavelength bands under field conditions, any reduction of the classification effort should yield the results faster. A decrease in the number of used bands by the aid of spectral subsets in the classification would accelerate image analyses. The use of the wavelength ranges determined by means of PCA decreases the calculation effort from 512 bands to 168 bands. The saving of time is enormous, but it comes along with an impairment of the classification results of the infected plants of 17% on average. The lowest tolerance of the classified degree of infection versus the rated degree of infection was 0.1%, the maximum tolerance was 36.9% ($n=6$). This was due to the misclassifications on the edges of the objects. The infection is overrated especially at the first six measurement dates because of the use of the band reduction with a threshold set to 0.1.

According to ENVI (2010), improvement of the classification compared to SAM without spectral subsets could be achieved with an alteration of the angle's radian from 0.1 to 0.05. Smaller angles generally represent closer matches to the reference spectrum (ENVI, 2005). Pixels further away than the specified maximum

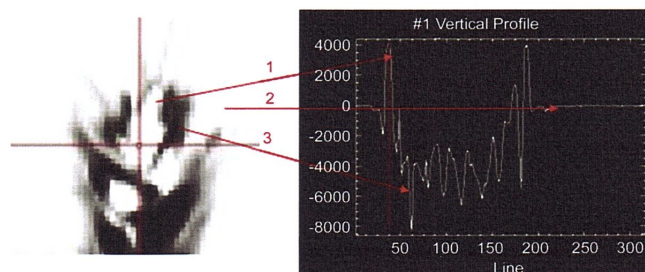


Fig. 5. Classified areas (HBI) of a part of an ear (left). Distinction of the grey-scale values: diseased (1) with grey-scale values >0 , healthy (3) with grey-scale values <0 , background (2) with grey-scale values of 0 (right).



Fig. 6. Example of a classification of *Fusarium* infected wheat ears (left: RGB image), center: grey-scale image according to HBI, right: classification result (dark grey/red: diseased, light grey/green: healthy). In this example, degree of infection was 52.5% (averaged over 4 ears) and the degree of infection calculated by HBI was 37.1% (averaged over 4 ears). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

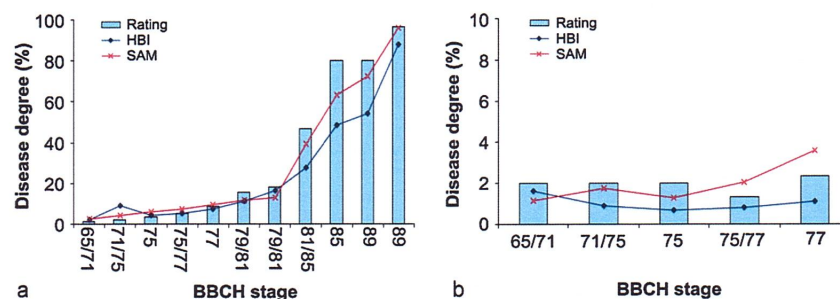


Fig. 7. Results of the classification using HBI (head blight index) and SAM (Spectral Angle Mapper) in comparison to rating (a – infected plants, b – control plants). Note the different scales of y-axis in (a) and (b).

angle threshold in radians are not classified. By manual adjustment of the angle's radian to 0.05, classification results could, indeed, be improved in many cases. The obtained classification error was, on average, only 4.7% that of the rated degrees of infection (minimum deviation 1.2%, maximum deviation 12.0%). However, this step was only advantageous for ears in the BBCH stages 89 because it also decreased the total number of classified pixel.

3.2.3. Discrimination of head blight at different stages of development of the wheat plants

In a time series experiment, spectra of healthy and diseased areas were recorded on 8 measurement days. These 292 spectra of diseased and 80 spectra of healthy ear areas were pre-processed and subsequently subjected to a PCA. Here, the PC1 was sufficient

to distinguish between diseased and healthy tissue areas, too. Fig. 9 shows the assignment of diseased ears according to their individual stages of development.

Diseased and healthy tissues were easily separable in the BBCH stages 71–85 (Fig. 9b). Shortly after infection (BBCH 65; Fig. 9a), a separation between healthy and diseased tissue was not possible because infection was not yet established. In BBCH stage 89 (ripeness), spectra of healthy and diseased ears overlapped again (Fig. 9c). However, the healthy areas are now determined as diseased due to the ripeness-related changes in pigment composition. Differentiation between diseased and healthy was not longer possible at this stage.

4. Discussion

In the spectral range (400–1000 nm) considered in this study, the spectral patterns of healthy and diseased ears were significantly different. Hence, head blight could be clearly identified on infected ears. Spectral changes during disease development were based on variations in the content of carotenoids (500–533 nm) and, especially, that of chlorophylls (560–675 nm and 682–733 nm). Furthermore, spectral variations in the range of 927–931 nm reflected differences in tissue water contents of healthy and diseased plant tissues. Although all the above wavelength ranges, identified by statistical analyses, clearly reflect physiological responses of plants, which are well-characterized by plant biologists, application of these mathematical methods was necessary to provide a sound basis for comprehensive image analyses.

Both for image analysis and spectral analysis various indices are commonly used. The most widespread index for the characterization of green vegetation is the so-called normalized difference

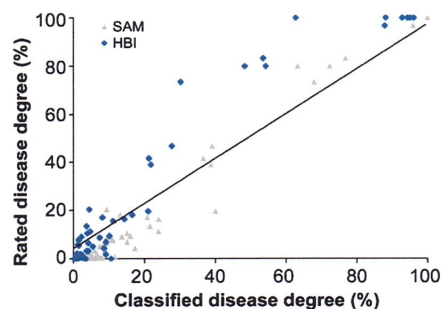


Fig. 8. Correlation between rated degrees of infection and those obtained by the two classification approaches: HBI (head blight index) and SAM (Spectral Angle Mapper). Results from two test series are shown ($n = 64$).

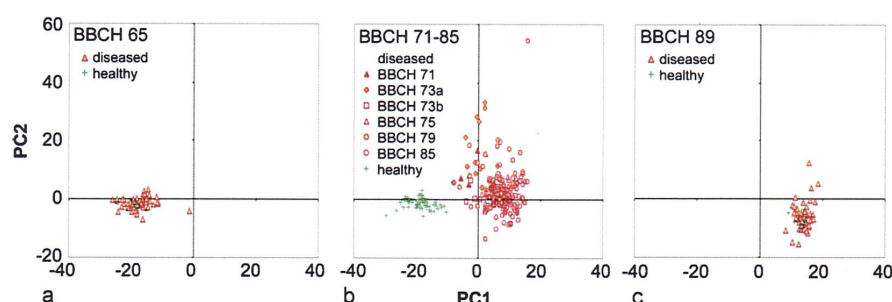


Fig. 9. Separability of healthy and diseased ears during ear development (PCA with 292 spectra of diseased tissue and 80 controls). Shown are the results obtained at BBCH 65 (a), BBCH 71–85 (b) and BBCH 89.

vegetation index (NDVI). However, NDVI is mainly helpful to study healthy, chlorophyll-containing plants. Hence, application of this index did not yield meaningful results in this study. The same was valid for other, often used indices, such as the greenness-band ($G = R_{554}/R_{677}$, Zarco-Tejada et al., 2005), structure intensive pigment index (SIPI, Peñuelas et al., 1995), normalized pigment chlorophyll index (NPCl, Peñuelas et al., 1994) or Lichtenthaler's indices (Lic1 and Lic2, Lichtenthaler et al., 1996a,b). They all were less suitable to separate healthy and *Fusarium*-infected wheat ears. For example, diseased areas cannot be explicitly indicated in case of greenness-band or NPCl because in *Fusarium* infected tissues the chlorophyll-free areas are of interest. Furthermore, with SIPI, a threshold to successfully detect infected tissues was always difficult to define.

In *Fusarium*-infected ear tissues, absorption in the range of the chlorophyll bands rapidly decreased with development of infection as a result of destruction of chloroplasts and, successively, degradation of chlorophylls in fungi attacked cells (Kang and Buchenauer, 2000). The decline in the chlorophyll content of these cells reduced the probability of internal photon re-emission and re-absorption processes in this wavelength range. This resulted in a pronounced shift (up to 15 nm) of the 'red-edge' inflection point of the spectra (Baret et al., 1988) from approximately 700 nm to shorter wavelengths.

In the present investigation, all the above changes became more pronounced with increasing degree of infection. Similarly, Muhammed and Larsolle (2003) reported progressive flattening of the green reflectance peak and stronger decrease in reflectance in near-infrared wavelength range with increasing disease-severity level (0.6%; 5.2%; 49.2%; 76.1%) of *D. tritici-repentis* infection in spring wheat leaves. Furthermore, these authors also found a comparable decrease in the near-infrared reflectance plateau accompanied by an enhanced reflectance in the visible region (550–750 nm) with the degree of infection.

The various supervised classification methods used for automatically identification seem to have their very specific advantages. In case of multispectral imaging with only few channels, good results were achieved with the classification method Maximum Likelihood (Castillejo-Gonzalez et al., 2009; Yang and Everitt, 2010). In contrast, Spectral Angle Mapper yielded good classification with hyperspectral images (South et al., 2004; Becker et al., 2007).

In an attempt to automatically identify *Fusarium*-infected wheat ears by means of RGB image analysis, Hehmke et al. (2007) applied two methods of supervised classification, Maximum Likelihood (Richards and Jia, 1999; ENVI, 2005) and SAM. In evaluations of the RGB images, recorded both under light and shade conditions, Maximum Likelihood always yielded better classification than SAM. However, compared to RGB, hyper-spectral images contain much more information because they are based on huge amounts of spectral bands. SAM allows 'rapid mapping of spectral similarity'

(Yuhas et al., 1992; Kruse et al., 1993) and commonly yields good classification results (South et al., 2004). It directly compares the similarity of various vectors (spectral angles) of several set classes, resulting in more efficient and highly exact classification results of hyper-spectral images, compared to e.g. Maximum Likelihood. Furthermore, image evaluations with SAM are independent of variations in object illumination. Hence, SAM seems to be suitable for classification under the semi-practical condition applied here.

Indeed, SAM yielded very good classification results in this study. However, recording and analyzing 512 wavelength bands needed considerable computing efforts. Unlike to laboratory studies, this may not be practical for inline application under practical outdoor conditions. Camera systems, installed on a tractor, must both record and analyze spectral information within seconds. Furthermore, comparison with disease-specific training spectra and setting regions of interest (ROI), respectively, is time-consuming and difficult to integrate in practical processes.

One approach to improve classification efficiency is to decrease the amount of spectral information. The effects of reducing the spectral range from 512 to 168 pre-selected, disease-relevant bands during recording as well as classification using SAM could be easily simulated in ENVI and its effectiveness validated on the basis of spectral subsets of the obtained hyper-spectral images. Clearly, a lower band density resulted in a much shorter computing time; however, faster results must be paid by a lower accuracy of classification. Reduction of the amount of bands resulted in over-estimated degree of disease in most cases. This effect was most pronounced during early ripening stage (BBCH 75). Nevertheless, even so the number of bands was reduced, this analysis requires the recording of the entire spectrum. In addition, the time-consuming necessity to set ROI remains. Based on all this, an estimated rate of misclassifications of up to 37% makes this method only less suitable for practical applications.

In contrast, the proposed head blight index (HBI) analyses only two spectral ranges of 10 nm width (665–675 nm and 550–560 nm). These two ranges reflect changes in the substantial photosynthetic pigments (chlorophylls and carotenoids), and efficiently indicate infection-induced physiological damages. As a result, both ranges show, by far, the most pronounced variation in the spectral signature. Applying HBI, data acquisition can be technically less sophisticated and their evaluation much faster. Thus, the HBI may represent a reasonably index for the early detection of *Fusarium* infection, although it is slightly less efficient than SAM. Approximately 84% of healthy and infected tissues fell within the error range of $\pm 10\%$. This error range seems to be acceptable because, on the other hand, evaluation failure of the standard visual rating usually also lies in the same range (Walther et al., 2000). Visual rating is unavoidably subjective and, hence, the error range may highly depend on the personnel skills of the evaluating person. On the other hand, accuracy of image analysis may simply be reduced by a

loss of information due to the two dimensional analysis compared to the truly three dimensional visual rating in the field (Walther et al., 2000).

Nevertheless, besides visual rating, no other method for the determination of the degree of disease seemed to be appropriate in this study. Certainly, mycotoxins would have been of special interest. However, mycotoxin contents of grains of only three disease degree classes could be determined at the end of the experiment due to the lack of sufficient material.

As clearly indicated by the presented results, time of determination is very important for a highly accurate classification of the degree of *Fusarium* infection in wheat. Determination of infection with hyper-spectral imaging is possible after 7 d after inoculation. Similar finding have been reported by Laguette et al. (2004) in their investigation on *Fusarium* infection in hard red spring wheat plants. By applying red (R), near infrared (NIR), and middle infrared (MIR) spectral bands, these authors found first substantial differences between the spectral signature of healthy and infected plants one week after flowering.

Under laboratory conditions, *Fusarium* infected ears could be successfully classified using HBI. However, to transfer the results to outdoor conditions further research is necessary. For this purpose, a camera system, which only analyses the relevant spectral difference in the ranges (550–560 nm and 665–675 nm) is suitable. Furthermore, constant camera angles and distances between camera and crop may allow including size and area of the ears into evaluation; thus, pixel clusters of distinct size, which were classified as diseased grains, could be set as a minimal degree of disease of 10%.

Clearly, this study was exclusively focused on very early detection of *Fusarium*-infection in winter wheat. If there is a need to classify healthy and diseased grains later than BBCH 85, i.e. in fully mature ears or during harvest, spectral measurements must be extended into the NIR range (Williams et al., 2010). Analyses of the NIR spectral range include measurements of changes in water content during progressing infection. Hence, it may add also valuable information for the correct estimation of the degree of disease in general and therewith to a better early detection of *Fusarium* infection.

5. Conclusion

The evaluated wavelength range between 400 and 1000 nm reliably detects head blight on wheat ears. Principal component analysis was applied to identify four distinct wavelength ranges (500–533 nm, 560–675 nm, 682–733 nm and 927–931 nm, respectively) that allow differentiation between spectra of diseased and healthy ear tissues.

Fusarium infestation cannot be detected by spectral analysis immediately after infection, due to missing symptoms. Correct separation of diseased and healthy tissues is also impossible if ears are fully ripe, and chlorophyll is decomposed, even in healthy tissues. However, occurrence of head blight can easily be recognized by spectral analysis during BBCH-stage 71–85. Separation of healthy and diseased tissues is most effective in BBCH-stage 75.

Applying the imaging analysis method 'Spectral Angle Mapper' (SAM) the degree of disease was classified 91% correct, considering a rating error of 10%. Due to the time-consuming and complex classification algorithm SAM, with 512 bands, and the need to set up regions of interests this method is not effectively applicable outdoor.

Extent of input and complexity of calculation can be largely decreased using spectral subsets. In this approach, only 168 wavelength bands were applied for classification of head blight.

The fastest classification was achieved with a new created head blight index (HBI). Based on Principal component analysis, wavelength ranges were found, which are pronouncedly different between healthy and diseased tissues. With those ranges a special index HBI was developed, which used only two ranges of 10 nm each for recognition of head blight but achieve good classification results.

In the entire period from BBCH 65–89, the hit rate was 67%. Considering the optimal time for classification, accuracy of detection can be largely increased with this index.

Acknowledgements

We thank Dr. H. Beuche, J. Intreß and K. Witzke for valuable technical support and Dr. B. Rodemann of the Julius-Kühn-Institute, Braunschweig, for providing the plant material. This investigation was supported by a grant of the German Federal Ministry of Education and Research (project ProSenso.net², BMBF 0339992).

References

- Baret, F., Guyot, G., Major, D., 1988. Coupled fluorescence and reflectance measurements to improve crop productivity evaluation. In: Lichtenthaler, H.K. (Ed.), *Application of Chlorophyll Fluorescence*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands, pp. 319–324.
- Bauriegel, E., Jordan, S., Zeitz, J., Bauriegel, A., Rühlmann, J., 2008. Spectral laser scanning microscopy – an attempt for an objective determination of the degree of peat decomposition. In: Farrell, C., Feehan, J. (Eds.), *Chemical, Physical and Biological Characteristics of Peat*. Tullamore, Ireland, pp. 117–120.
- Bauriegel, E., Beuche, H., Dammer, K.-H., Giebel, A., Herppich, W.B., Intreß, J., Rodemann, B., 2009. Detection of head blight (*Fusarium* spp.) at ears of winter wheat using hyperspectral and chlorophyll fluorescence imaging. In: van Henten, E.J., Goense, D., Lokhorst, C. (Eds.), *Precision Agriculture'09. Proceedings of the Joint International Agricultural Conference*. Academic Publishers, Wageningen, pp. 203–210.
- Bauriegel, E., Giebel, A., Herppich, W.B., 2010. Rapid *Fusarium* head blight detection on winter wheat ears using chlorophyll fluorescence imaging. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 83 (2), 196–203.
- Becker, B.L., Lusch, D.P., Qi, J., 2007. A classification-based assessment of the optimal spectral and spatial resolutions for Great Lakes coastal wetland imagery. *Remote Sensing of Environment* 108, 111–120.
- Benito, M.T.J., Ojeda, C.B., Rojas, F.S., 2008. Process analytical chemistry: applications of near infrared spectrometry in environmental and food analysis: an overview. *Applied Spectroscopy Reviews* 43 (5), 452–484.
- Bravo, C., Moshou, D., Oberti, R., West, J., McCartney, A., Bodria, L., Ramon, H., 2004. Foliar disease detection in the field using optical sensor fusion. In: *Agricultural Engineering International: The CIGR Journal of Scientific Research and Development*, vol. 6, p. 14, Manuscript FP 04 008.
- Castillejo-Gonzalez, L.L., Lopez-Granados, F., Garcia-Ferrer, A., Peña-Barragán, J.M., Jurado-Expósito, F., Sánchez de la Ordena, M., González-Audicanac, M., 2009. Object- and pixel-based analysis for mapping crops and their agro-environmental associated measures using QuickBird imagery. *Computers and Electronics in Agriculture* 68 (2), 207–215.
- Delwiche, S.R., 2003. Classification of scab- and other mold-damaged wheat kernels by near-infrared reflectance spectroscopy. *Transactions of the ASAE* 46 (3), 731–738.
- Devadas, R., Lamb, D.W., Simpfordorfer, S., Backhouse, D., 2009. Evaluating ten spectral vegetation indices for identifying rust infection in individual wheat leaves. *Precision Agriculture* 10 (6), 459–470, doi:10.1007/s11119-008-9100-2.
- Dowell, F.E., Ram, M.S., Seitz, L.M., 1999. Predicting scab, vomitoxin, and ergosterol in single wheat kernels using near-infrared spectroscopy. *Cereal Chemistry* 76 (4), 573–576.
- Envi, 2010. Tutorial: Selected Hyperspectral Methods. www.creaso.com (assessed 01.07.10).
- ENVI User's Guide, 2005. Research Systems, Inc., USA, 1–1202.
- Franke, J., Menz, G., Oerke, E.-C., Rascher, U., 2005. Comparison of multi- and hyper-spectral imaging data of leaf rust infected wheat plants. In: Owe, M., Urso, G.D. (Eds.), *Remote Sensing for Agriculture, Ecosystems and Hydrology VII. Proceedings of SPIE Vol. 5976*, pp. 349–359.
- Fitzgerald, G., Rodriguez, D., O'Leary, G., 2010. Measuring and predicting canopy nitrogen nutrition in wheat using a spectral index – the canopy chlorophyll content index (CCCI). *Field Crops Research* 116, 318–324.
- Helmke, M., Dammer, K.H., Herppich, W.B., Hellebrand, J., Beuche, H., Rodemann, B., 2007. Digital image analysis for detection of head blight (*Fusarium* spp.) in winter wheat. In: Bleiholder, H. (Ed.), *Proceedings of the International Symposium. Agricultural Field Trials – Today and Tomorrow*. Grauer, Stuttgart, pp. 56–61.
- Johnson, D.D., Flakerud, G.K., Taylor, R.D., Satyanarayana, V., 2005. Quantifying economic impacts of *Fusarium* head blight in wheat. In: Leonard, K.J., Bushnell, W.R. (Eds.), *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley*. The American Phytopathological Society, APS Press, St. Paul, Minnesota, pp. 461–484.

- Kang, Z., Buchenauer, H., 2000. Cytology and ultrastructure of the infection of wheat spikes by *Fusarium culmorum*. *Mycological Research* 104, 1083–1093.
- Kruse, F.A., Lefkoff, A.B., Boardman, J.W., Heidebrecht, K.B., Shapiro, A.T., Barloo, P.J., Goetz, A.F.H., 1993. The spectral image processing system (SIPS) – interactive visualization and analysis of imaging spectrometer data. *Remote Sensing of Environment* 44, 145–163.
- Laguette, S., Hollingsworth, C.R., Motteberg, C.D., MacRae, I., 2004. Potentials and limits of remote sensing data for detection of *Fusarium* head blight on hard red spring wheat in Minnesota. In: Mulla, D.J. (Ed.), *Proceedings of the 7th International Conference on Precision Agriculture and Other Precision Resources Management*. Minneapolis, USA, pp. 1196–1203.
- Lancashire, P.D., Bleiholder, H., Vandenboom, T., Langeluddeke, P., Strauss, R., Weber, E., Witzengerber, A., 1991. A uniform decimal code for growth-stages of crops and weeds. *Annals of Applied Biology* 119, 561–601.
- Leonard, K.J., Bushnell, W.R., 2005. Preface. In: Leonard, K.J., Bushnell, W.R. (Eds.), *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley*. The American Phytopathological Society, APS Press, St. Paul, Minnesota, pp. iii–vi.
- Li, F., Miao, Y.X., Hennig, S.D., Gnyp, M.L., Chen, X., Jia, L., Bareth, G., 2010. Evaluating hyperspectral vegetation indices for estimating nitrogen concentration of winter wheat at different growth stages. *Precision Agriculture* 11 (4), 335–357.
- Lichtenthaler, H.K., Gitelson, A., Lang, M., 1996a. Non-destructive determination of chlorophyll content of leaves of a green and an aurea mutant of tobacco by reflectance measurements. *Journal of Plant Physiology* 148 (3–4), 483–493.
- Lichtenthaler, H.K., Lang, M., Sowinska, M., Heisel, F., Miehl, J.A., 1996b. Detection of vegetation stress via a new high resolution fluorescence imaging system. *Journal of Plant Physiology* 148, 599–612.
- McCormick, S., 2005. The role of DON in pathogenicity. In: Leonard, K.J., Bushnell, W.R. (Eds.), *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley*. The American Phytopathological Society, APS Press, St. Paul, Minnesota, pp. 165–183.
- Merzlyak, M.N., Solovchenko, A.E., Smagin, A.I., Gitelson, A.A., 2005. Apple flavonols during fruit adaptation to solar radiation: spectral features and technique for non-destructive assessment. *Journal of Plant Physiology* 162, 151–160.
- Merzlyak, M.N., Melø, T.B., Naqvi, K.R., 2008. Effect of anthocyanins, carotenoids, and flavonols on chlorophyll fluorescence excitation spectra in apple fruit: signature analysis, assessment, modelling, and relevance to photoprotection. *Journal of Experimental Botany* 59 (2), 349–359.
- Muhammed, H.H., Larsolle, A., 2003. Feature vector based analysis of hyperspectral crop reflectance data for discrimination and quantification of fungal disease severity in wheat. *Biosystems Engineering* 86, 125–134.
- Nilsson, H.-E., 1995. Remote sensing and image analysis in plant pathology. *Annual Review of Phytopathology* 15, 489–527.
- Nicotra, A.B., Hofmann, M., Siebke, K., Ball, M.C., 2003. Spatial patterning of pigmentation in evergreen leaves in response to freezing stress. *Plant Cell and Environment* 26, 1893–1904.
- Peguero-Pina, J.-J., Morales, F., Flexas, J., Gil-Pelegrín, E., Moya, I., 2008. Photochemistry, remotely sensed physiological reflectance index and de-epoxidation state of the xanthophyll cycle in *Quercus coccifera* under intense drought. *Oecologia* 156 (1), 1–11.
- Peiris, K.H.S., Pumphrey, M.O., Dowell, F.E., 2009. NIR absorbance characteristics of deoxynivalenol and of sound and *Fusarium*-damaged wheat kernels. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 17, 213–221.
- Peñuelas, J., Gamon, J.A., Fredeen, A.L., 1994. Reflectance indexes associated with physiological-changes in nitrogen-limited and water-limited sunflower leaves. *Remote Sensing of Environment* 48 (2), 135–146.
- Peñuelas, J., Baret, F., Filella, I., 1995. Semiempirical indexes to assess carotenoids chlorophyll-a ratio from leaf spectral reflectance. *Photosynthetica* 31 (2), 221–230.
- Polder, G., van der Heijden, G.W.A.M., Young, I.T., 2002. Spectral image analysis for measuring ripeness of tomatoes. *Transactions of the ASAE* 45 (4), 1155–1161.
- Polder, G., van der Heijden, G.W.A.M., Waalwijk, C., Young, I.T., 2005. Detection of *Fusarium* in single wheat kernels using spectral imaging. *Seed Science and Technology* 33, 655–668.
- Pozdnyakova, L., Oudemans, P.V., Hughes, M.G., Gimenez, D., 2002. Estimation of spatial and spectral properties of phytophthora root rot and its effects on cranberry yield. *Computers and Electronics in Agriculture* 37, 193–247.
- Richards, J.A., Jia, X., 1999. Supervised Classification Techniques. In: *Remote Sensing Digital Image Analysis*. Springer-Verlag GmbH, Heidelberg, pp. 193–247.
- Rascher, U., Nichol, C.J., Small, C., 2005. Hyperspectral imaging of photosynthesis from the single leaf to the complex canopy – understanding the spatio-temporal variations of photosynthesis within a drought-stressed tropical canopy. In: Zagajewski, B., Sobczak, M., Wrzesien, M. (Eds.), *New Quality in Environmental Studies. Proceedings of 4th EARSeL Workshop on Imaging Spectroscopy*. Warsaw, pp. 709–719.
- Sankaran, S., Mishra, A., Ehsani, R., Davis, C., 2010. A review of advanced techniques for detecting plant diseases. *Computers and Electronics in Agriculture* 72, 1–13.
- Solovchenko, A.E., Chivkunova, O.B., Merzlyak, M.N., Gudkovsky, V.A., 2005. Relationships between chlorophyll and carotenoid pigments during on- and off-tree ripening of apple fruit as revealed non-destructively with reflectance spectroscopy. *Postharvest Biology and Technology* 38, 9–17.
- South, S., Qi, J., Lusch, D.P., 2004. Optimal classification methods for mapping agricultural tillage practices. *Remote Sensing of Environment* 91, 90–97.
- Walther, U., Flath, K., Moll, E., Prochnow, J., Sachs, E., 2000. Methodische Anleitung zur Bewertung der partiellen Resistenz von Sorten bzw. Linien unter Berücksichtigung epidemiologischer Aspekte. (Methodological instruction for the assessment of partial resistance of species and lines considering epidemiological aspects). *Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft* 374, 9–25.
- West, J.S., Bravo, C., Oberti, R., Lemaire, D., Moshou, D., McCartney, H.A., 2003. The potential of optical canopy measurement for targeted control of field crop diseases. *Annual Review of Phytopathology* 41, 593–614.
- Williams, P., Manley, M., Fox, G., Geladi, P., 2010. Indirect detection of *Fusarium verticillioides* in maize (*Zea mays* L.) kernels by near infrared hyperspectral imaging. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 18, 49–58.
- Wiwart, M., Kocowska, I., Borusiewicz, A., 2001. Estimation of *Fusarium* head blight of Triticale using digital image analysis of gain. In: Skarbek, W. (Ed.), *Computer Analysis of Images and Patterns 2124*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 563–569.
- Wulf, J.S., Rühmann, S., Regos, I., Puhl, I., Treutter, D., Zude, M., 2008. Nondestructive application of laser-induced fluorescence spectroscopy for quantitative analyses of phenolic compounds in strawberry fruits (*Fragaria x ananassa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (9), 2875–2882, doi:10.1021/jf072495i.
- Yang, C., Everitt, J.H., 2010. Comparison of hyperspectral imagery with aerial photography and multispectral imagery for mapping broom snakeweed. *International Journal of Remote Sensing* 31 (20), 5423–5438.
- Yang, F., Li, J.L., Gan, X.Y., Qian, Y.R., Wu, X.L., Yang, Q., 2010. Assessing nutritional status of *Festuca arundinacea* by monitoring photosynthetic pigments from hyperspectral data. *Computers and Electronics in Agriculture* 70, 52–59.
- Yuhas, R.H., Goetz, F.H.A., Boardmann, J.W., 1992. Discrimination among semiarid landscape end members using the Spectral Angle Mapper (SAM) algorithm. In: *Summaries of the Third Annual JPL Airborne Geoscience Workshop, Jet Propulsion Laboratory Publication 92*, Pasadena, CA, pp. 147–149.
- Zarco-Tejada, P.J., Ustin, S.L., Whiting, M.L., 2005. Temporal and spatial relationships between within-field yield variability in cotton and high-spatial hyperspectral remote sensing imagery. *Agronomy Journal* 97, 641–653.

3.3 Hyperspectral and chlorophyll fluorescence imaging to analyse impacts of *Fusarium culmorum* on photosynthetic integrity of infected wheat ears

Dieser Artikel vergleicht beide Methoden und stellt Vor- und Nachteile dieser bei der Erkennung der Partiellen Taubährigkeit dar. Das mögliche Detektionszeitfenster für beide Methoden wird anhand von Zeitreihenversuchen ebenso aufgezeigt wie die Genauigkeit der Erkennung mittels Chlorophyllfluoreszenzanalyse sowie die Grenzen der bestehenden Bildauswertemethoden speziell des 'Spectral Angle Mapper' in der Hyperspektralanalyse. Zusätzlich werden die Ergebnisse einer Feldmessung mittels Chlorophyllfluoreszenzanalyse dargestellt.

BAURIEGEL, E., GIEBEL, A., HERPPICH, W. B. (2011): Hyperspectral and chlorophyll fluorescence imaging to analyse impacts of *Fusarium culmorum* on photosynthetic integrity of infected wheat ears. *Sensors* 11 (4): 3765-3779.

Article

Hyperspectral and Chlorophyll Fluorescence Imaging to Analyse the Impact of *Fusarium culmorum* on the Photosynthetic Integrity of Infected Wheat Ears

Elke Bauriegel ^{1,*}, Antje Giebel ¹ and Werner B. Herppich ²

¹ Department of Engineering for Crop Production, Leibniz-Institute for Agricultural Engineering Potsdam-Bornim, D-14469 Potsdam, Germany; E-Mail: agiebel@atb-potsdam.de

² Department of Horticultural Engineering, Leibniz-Institute for Agricultural Engineering Potsdam-Bornim, D-14469 Potsdam, Germany; E-Mail: wherppich@atb-potsdam.de

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: ebauriegel@atb-potsdam.de; Tel.: +49-331-5699-414; Fax: +49-331-5699-849.

Received: 24 January 2011; in revised form: 23 March 2011 / Accepted: 25 March 2011 /

Published: 28 March 2011

Abstract: Head blight on wheat, caused by *Fusarium* spp., is a serious problem for both farmers and food production due to the concomitant production of highly toxic mycotoxins in infected cereals. For selective mycotoxin analyses, information about the on-field status of infestation would be helpful. Early symptom detection directly on ears, together with the corresponding geographic position, would be important for selective harvesting. Hence, the capabilities of various digital imaging methods to detect head blight disease on winter wheat were tested. Time series of images of healthy and artificially *Fusarium*-infected ears were recorded with a laboratory hyperspectral imaging system (wavelength range: 400 nm to 1,000 nm). Disease-specific spectral signatures were evaluated with an imaging software. Applying the ‘Spectral Angle Mapper’ method, healthy and infected ear tissue could be clearly classified. Simultaneously, chlorophyll fluorescence imaging of healthy and infected ears, and visual rating of the severity of disease was performed. Between six and eleven days after artificial inoculation, photosynthetic efficiency of infected compared to healthy ears decreased. The severity of disease highly correlated with photosynthetic efficiency. Above an infection limit of 5% severity of disease, chlorophyll fluorescence imaging reliably recognised infected ears. With this technique, differentiation of the severity of disease was successful in steps of 10%. Depending on the quality of chosen regions of interests, hyperspectral imaging readily detects head blight 7 d after inoculation

up to a severity of disease of 50%. After beginning of ripening, healthy and diseased ears were hardly distinguishable with the evaluated methods.

Keywords: chlorophyll defect; fungal diseases; non-destructive; non-invasive sensor application; potential maximum photochemical efficiency of PSII (F_v/F_m); *Triticum aestivum* L. 'Taifun'

1. Introduction

Many *Fusarium* spp. may cause serious grain contamination with mycotoxins (trichothecenes), mainly deoxynivalenol (DON) and 3-acetyl DON (3-ADON), on wheat [1]. Up to now, true infection of ears can only be determined with time consuming and expensive pre- and postharvest laboratory tests (serological rapid tests, Fast-DON-ELISA-test, counting methods; [2]). Thus, the ability to identify infections in the field could prevent exploitation of contaminated grain lots, finally, reducing toxin-burden of food- and feedstuffs.

Head blight, like other fungal and viral infections, is characterised by a complete destruction of the cellular integrity of the impacted tissues leading to cell death and degradation of chlorophylls. Damage is mostly accompanied by a transient increase in transpiration, followed by tissue desiccation. The resulting variation of tissue temperature has been successfully detected by thermal imaging, at least under controlled conditions [3]. On the other hand, chlorophyll degradation by means of spectral analysis in the visible range [4] allows detection of infected plant parts [5,6]. Application of spectral indices such as Normalized Difference Vegetation Index (NDVI), which has been shown to rapidly indicate plant stress [7], may provide a good discrimination between healthy and infected plant parts [8]. Including the NIR range in spectral analyses may increase the efficiency of discrimination because this wavelength range additionally includes information about tissue water content [9,10].

Providing further knowledge about local centres of infections, imaging methods are especially suitable for rapid and non-invasive identification of the effective stage of plants disease in the field. In this context, spectral imaging was used to diagnose viral infections [11] and to identify spatially variable physiological processes of leaves [12]. Hyperspectral analyses have been applied to detect fungal-based grain crop diseases [13-15]. Furthermore, by the combination of both hyperspectral reflection measurements and chlorophyll fluorescence analyses (CFA) the discrimination of yellow rust on winter wheat could have been improved to an accuracy of 94–95% [5].

CFA does not only measure the externally visible effects of infection-induced chlorophyll breakdown; it also provides comprehensive insight into potential and actual photosynthetic activity [16,17]. Photosynthesis is often considerably affected by both biotic and abiotic stresses at very early stages [18,19]. In addition, CFA imaging has already been universally applied, for instance for evaluation of the vitality of plant tissues [20,21], diseases like leaf rust and powdery mildew on cereals [22] or the infection by the tobacco mosaic virus [23].

For the detection of head blight, both methods have been shown to have great potential [24,25]. In this study, both imaging methods were applied in parallel to comprehensively analyse the respective ability of early detection of head blight disease in winter wheat ears both under laboratory and field

conditions. Additional aims were: (1) to determine the highest possible accuracy of the detection of *Fusarium* infection; (2) to characterise the exact timeframe for meaningful head blight detection and (3) to determine the effect of the level of infection on detection accuracy.

2. Experimental Section

2.1. Materials and Experimental Design

Sixteen wheat caryopses (*Triticum aestivum* L. 'Taifun') were sown in eight pots (0.18 m × 0.18 m). From these, four pots were used for controls and four for infected samples, respectively. After germination, plants were cultivated in a greenhouse. After the start of flowering, plants were inoculated with a water suspension of *Fusarium culmorum* spores at a concentration of 250,000 spores per mL on three successive days. To guarantee the spread of germs, plants were kept at 20 ± 2 °C, high humidity (70%) and an illumination period of 12 h (high-pressure sodium-vapour lamps, SON-T Plus 400 W, Philips GmbH, Hamburg, Germany). Measurements started immediately after inoculation.

Developmental stages of ears were always graded according to the BBCH scale [26], which empirically describes plant development from dry seeds (BBCH 00) until the harvest product (BBCH 99). In the laboratory, plant infection levels were visually rated three times a week. Using sample pictures of infected ears, percentage infection of blighted spikelets per ear was estimated following [27]. Estimation of severity of disease occurred in distinct steps of 1%, 2%, 3%, 5% of damage at low infection levels and in 10%-steps at higher severity. All measurements were performed on intact plants. As a unit of visual rating of head blight disease pattern, the "severity of disease" (sod) was defined. During the course of this study three independent experiments were performed to comprehensively analyse both disease development and disease recognition accuracy.

2.2. Chlorophyll Fluorescence Imaging

Chlorophyll fluorescence imaging was performed with a modular system (FluorCAM 700MF, PSI, Brno, Czech Republic) measuring sequences of fluorescence images with a user-defined timing of set points, measurement intervals and irradiance [21,28,29]. Basic fluorescence F_0 was induced by two panels of super-bright orange light emitting diodes ($\lambda_{\text{max}} = 620$ nm, 345 LED per panel; approx. $3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Maximum fluorescence (F_m) was triggered by short-term (1 s) saturation light pulses (max. $2,500 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) generated by an electronic shutter-equipped halogen lamp (250 W).

The ratio of variable fluorescence ($F_v = F_m - F_0$) to maximum fluorescence, F_v/F_m , is an indicator of the potential maximum photochemical efficiency of photosystem II. It ranges between 0 (chlorophyll-less, dead plants) and 0.84 for healthy, intact plant parts under optimal conditions [17]. F_v/F_m is well-known as a valuable tool to determine both capacity and stability of photosynthesis [29,30]. A CCD camera with a F1.2/2.8–6 mm objective and a filter system (high pass 695 nm, low pass 780 nm) recorded fluorescence images (12-bit, 512×512 pixel; maximal frequency 50 images s^{-1}) synchronously with the weak, non-actinic measuring-light pulses. The system was controlled by the FluorCam software (PSI, Brno, Czech Republic). In the laboratory, measurements lasted 4 s (F_0 : 3 s duration, 4 frames recorded; F_m : 1 s duration, 25 frames recorded) and were performed on plants, dark-adapted for 10 min. Six samples of both infected and control plants were continuously recorded in time series

experiments. In addition, fifteen plants with pronounced head blight symptoms were investigated at BBCH stage 75. All plants were measured from the side at a distance of 0.2 m between ears and CCD-camera.

In addition, chlorophyll fluorescence imaging was applied on artificially infected winter wheat plants (BBCH stage 77/79) of the cultivars 'Cardos', 'Winnetou' and 'Drifter' (all resistance class 5) directly in the field. To eliminate the effects of direct sunlight on fluorescence and to pre-darken (10 min) the plants, they were partially shielded with a paper box (approx. 0.9 m × 0.9 m × 0.9 m) during measurements. The duration of the fluorescence measurements was reduced to 2 s (*i.e.*, 1 s for F_0 measurements and 1 s for F_m). In total, 50 ears of varying levels of infection were investigated. Only optimally illuminated images with clearly distinguishable ears ($n = 30$) were further analysed in this experiment.

For a further evaluation and derivation of severity of disease (sod), in the chlorophyll fluorescence images, all F_v/F_m -pixel values were allocated to "efficiency classes" of photosynthetic activity at steps of 0.05. In addition, they were accumulated to a "cumulative F_v/F_m " (%), starting from the lowest values (0.00).

2.3. Hyperspectral Imaging

The laboratory hyperspectral imaging device recorded reflection spectra in a wavelength range of 400 to 1,000 nm with a spectral resolution of 2.5 nm. General pixel-resolution of the camera was 1,392 × 1,024 px; however, two pixels per axis were combined to yield an effective resolution of 696 × 512 px. The field of view achieved generally resulted in a spatial resolution of approx. 0.4 mm per pixel. The system comprised a spectrograph (ImSpector V10E, Spectral Imaging Ltd., Oulu, Finland), a 12 bit, digitally temperature-compensated b/w camera (Pixelfly qe, PCO AG, Kelheim, Germany) and an accessory rotating mirror with a micro-step motor. The hyperspectral camera stored the spectra of all pixels of an image line by line. A program, developed under LabView 8.2 (National Instruments Corporation, Austin, TX, USA), was used to control the camera system and for data pre-processing, including the black/white calibration of the spectra. For this calibration, images for the black and the white adjustment were recorded with each measurement. The b/w-balance [(sample-black)/(white-black)] was performed for the entire frame during the following conversion of the hyperspectral images into the byte stream format. Heterogeneities in the pixel response across the sensor area were generally rather low and, therefore, not compensated for. The samples were illuminated with a stabilised halogen lamp (150 W). In addition to the six ears per variant used for chlorophyll fluorescence analysis, further six plants were examined by hyperspectral imaging with a time lag of approximately two days during three weeks (total $n_{\text{infected}} = n_{\text{controls}} = 12$). All plants were recorded from the side at a distance of 0.5 m between plant and camera. To avoid vibrations, the ears were fixed on a black background. Exposure time, adjusted for the respective samples, was in the range of 20 to 25 ms; a complete record lasted 20 to 30 min.

2.4. Data Analysis

The classification of diseased and healthy areas was performed with the software ENVI (Research Systems Inc., Boulder, CO, USA) by means of monitored classifications in the "Spectral Angle

Mapper" (SAM) evaluation algorithm. SAM compares the classifying spectrum of an image with a reference spectrum. The classes are allocated according to their similarity. The distinction of two reflection spectra is described with an angle, which span between related vectors [31,32]. In this paper, a vector in a multidimensional space (512 bands) was used. In addition, SAM was chosen because it is insensitive to variations of illumination [33].

The threshold of similarity of compared spectral angles was 0.1. For this purpose, regions of interest (ROIs) were established as the bases for the classification according to the two classes, diseased (8 ROIs) and healthy (10 ROIs). In a three-band false colour image (450 nm, 550 nm, 650 nm), diseased and healthy areas could be distinguished by visual inspection, which facilitated the proper manual setting of ROIs. These 18 ROIs were used to build an endmember, applied in the further calculations. To consider the effect of plant development, single hyperspectral images were repeatedly used as training images for setting ROIs. These images were excluded from later evaluation. After classification, the relative portions of pixels per image belonging to the healthy, diseased and unclassified object classes were determined. In this context, all pixels which could not be allocated to the defined classes "healthy" and "diseased" were assigned to the class "unclassified". The proportion of unclassified pixels was calculated as the difference between 100% and the sum of healthy and diseased pixels.

3. Results

The development of *Fusarium* infection, rated as severity of disease (sod), and the relevant BBCH stage of plants at respective days after inoculation (dai) are shown for the first time-series experiment in Table 1. The first symptoms of the disease became visible at the BBCH stage 71/75 (7 dai), first ripening symptoms developed in the BBCH stage 81.

Table 1. Representative example of plant development (BBCH stage) and rated disease symptoms of head blight (severity of disease, sod, n = 6).

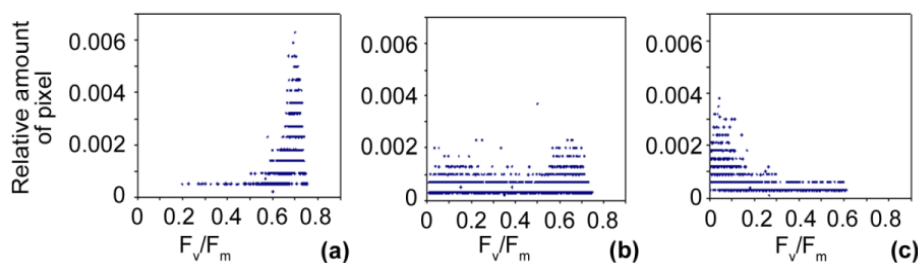
dai	5	7	9	11	14	16	18	21	23	25
BBCH	65/71	71/75	75	75/77	77/79	79/81	79/81	81/85	85	89
sod (%)	0	3	5	6	9	16	19	60	82	90

3.1. Chlorophyll Fluorescence Imaging

Distribution analyses of chlorophyll fluorescence images of ears with a sod between 2 and 100% revealed that, in weakly diseased ears (2%), as in healthy ears, pixel-values of photosynthetic efficiency (F_v/F_m) concentrated in classes of high efficiency [0.55–0.75; Figure 1(a)]. The pixelwise F_v/F_m -distribution was nearly identical in control plants and very weakly diseased ears (data not shown).

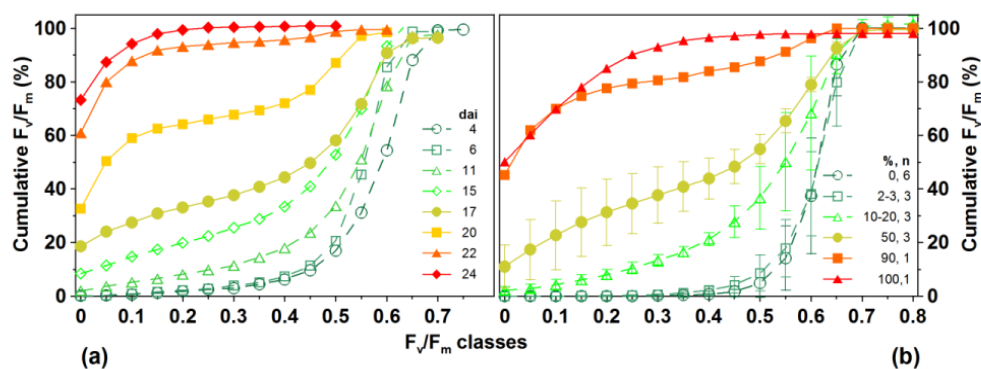
In medium infected ears (50%), the distribution of F_v/F_m broadened [Figure 1(b)] due to the co-existence of both healthy (pixel-value range 0.40–0.75) and diseased tissues (pixel-value range 0.00–0.40). In strongly infected ears [Figure 1(c)], pixel-values of photosynthetic efficiency only concentrated in the low-value range (0.00–0.20).

Figure 1. Pixelwise distribution of the maximum photochemical efficiency (F_v/F_m) of (a) weakly (2%), (b) medium (50%) and (c) strongly infected (90%) wheat ears.



Cumulative F_v/F_m appropriately characterised the head blight development of representative ears (Figure 2). At an early infection state [Figure 2(a), dai 4–6], only a few pixel values were found in low efficiency classes, while 80% of F_v/F_m -pixel values concentrated in high photosynthesis efficiency classes (>0.6) in a healthy or weakly diseased (2–3% infection) ear. Continuous development of infection during the course of the experiment from dai 6 to dai 22 could be easily identified by an increasing concentration of accumulated F_v/F_m -values in low efficiency classes. This means that moderately diseased ears (40–60%) comprised both photosynthetically active and inactive areas. In contrast, cumulative F_v/F_m obtained only low efficiency classes (<0.3) if the ear was strongly diseased (90%) 22 d after infection. This is also verified if the variation of average cumulative F_v/F_m values of various plants of different sod is analysed [Figure 2(b)]. In this context, a cumulative F_v/F_m at 0.3 seems to represent a relevant threshold to differentiate diseased and healthy ears.

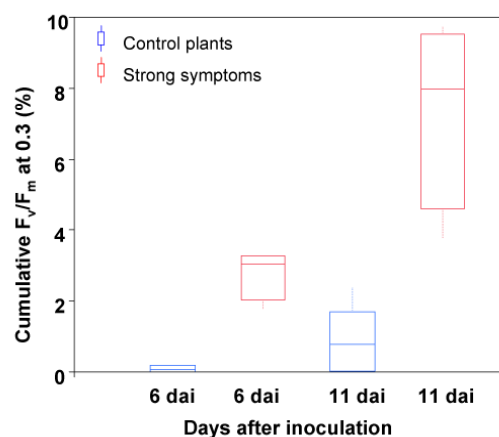
Figure 2. Cumulative F_v/F_m -values (%) (a) during several stages of head blight development of a single representative ear (b) Average cumulative percentage of F_v/F_m -values of ears at different levels of infection at dai 11.



During early infection and at low infection state (sod 2% to 3%), cumulative photosynthetic efficiency of investigated ears overlapped indicating that visual rating and CFA imaging did not obtain completely identical results [Figure 2(b)]. On the other hand, controls and clearly infected ears (sod ca. 5% at dai 11) could be successfully differentiated by analysing the cumulative F_v/F_m classes at 0.3

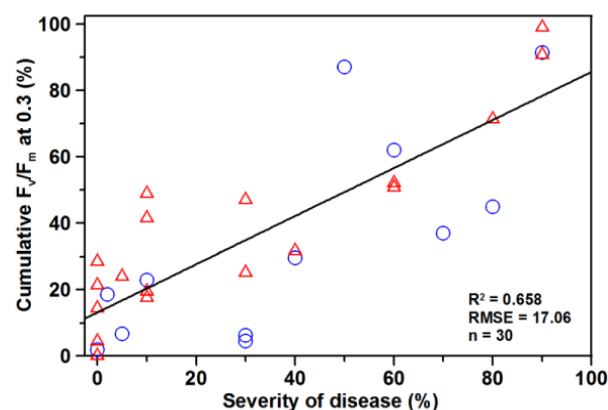
(Figure 3). Even at the first day of measurement (dai 6) the cumulative proportion of low efficiency classes was 3% higher than the control value, and rose to a median of nearly 8% within one week (dai 11). Up to a sod of 4%, F_v/F_m of diseased and control ears did not differ. Even with a sod of 10%, plants showed only minor visible symptoms of head blight one week after inoculation.

Figure 3. Cumulative F_v/F_m values at 0.3 of controls (blue) and strongly (defined as 5% sod at dai 11) infected ears (red).



Field application of CFA imaging yielded in more variable differentiation of ears according to the severity of disease than laboratory studies (Figure 4). Discrepancy between visual inspection and CFA was more pronounced at low infection (sod < 30%). Nevertheless, ears with medium (40–50%) and high (70–80% and 90%, respectively) sod could easily be identified. Overall, correlation between the cumulative F_v/F_m and sod was high in this experiment yielding a coefficient of determination of 0.658 (Figure 4).

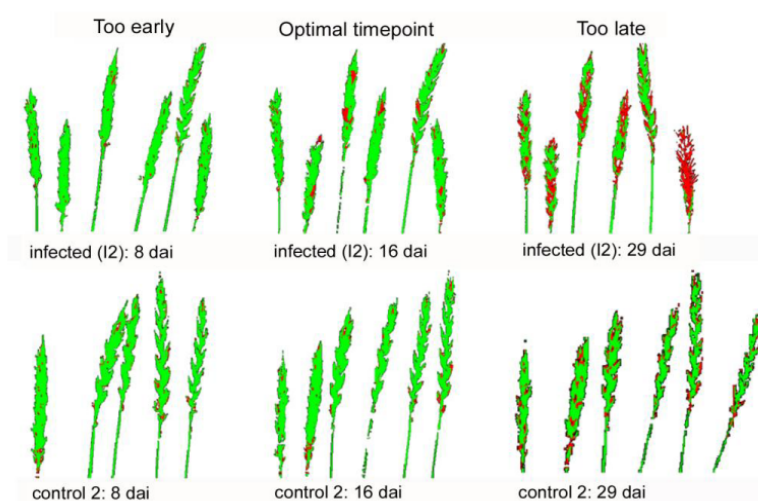
Figure 4. Correlation between the cumulative F_v/F_m at 0.3 and the severity of disease obtained from visual rating (circles: 23 June 2009, triangles: 24 June 2009).



3.2. Hyperspectral Measurements

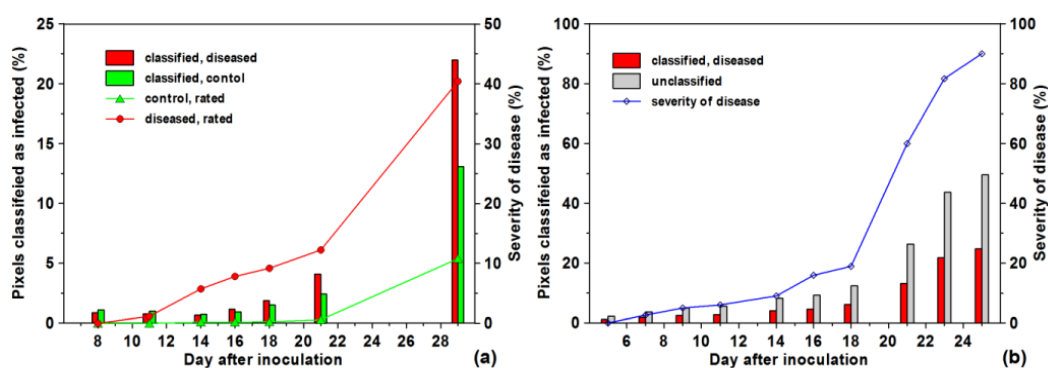
Time series experiments showed that differentiation by hyperspectral imaging was most effective at 14 ± 2 dai (Figure 5, dai 16 shown). It was less effective and, hence, results less reliable soon after infection and, again, after the beginning of maturation *ca.* four weeks after infection.

Figure 5. Samples of classification results using SAM classification (green: healthy classified tissues, red: diseased classified tissues). Upper row: infected ears, lower row: controls).



Results of classification of the levels of infection, obtained from hyperspectral imaging by the SAM algorithm, reflected those of the visual rating [Figure 6(a)].

Figure 6. (a) Results SAM-based classification of infected and control ears ($n = 12$) in comparison with the severity of disease obtained by visual rating during the course of infection development. **(b)** Proportion of pixels classified as infected and those unclassified by the SAM algorithm in comparison with the severity of disease obtained by visual rating ($n = 6$). Results of healthy ears are not shown.

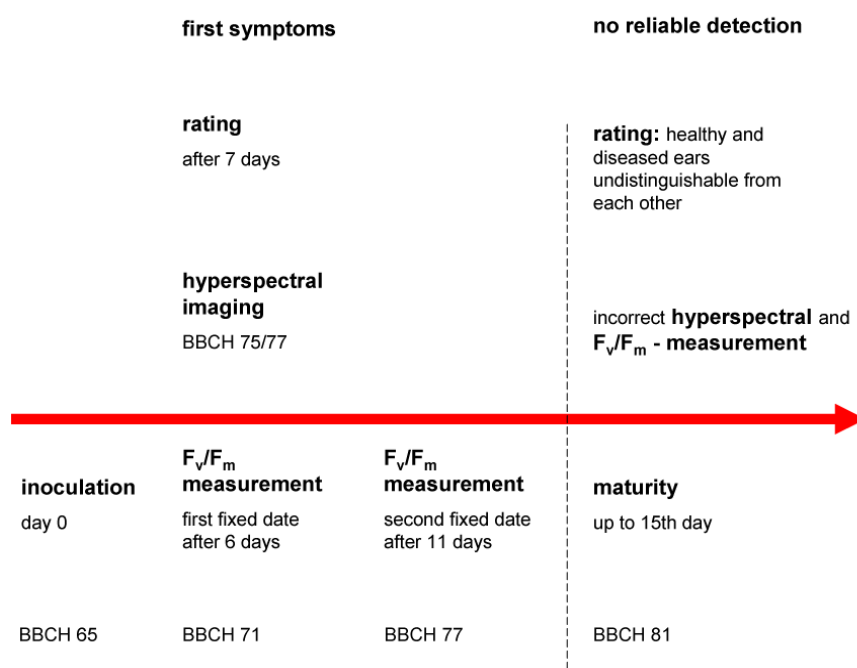


For this comparison, proportions of the whole ears, classified as diseased, were related to the total number of classified pixels (healthy + diseased, see Figure 5). During early infection, starting from BBCH-stage 75, the sod obtained by spectral classification was always lower than that rated visually; it became closer at the beginning of ripening. Head blight was well separated from healthy tissues after the onset of ripening (from BBCH 81, dai 21). However, at this stage, pixels, which previously were classified as healthy, were now increasingly ascribed as unclassified [Figure 6(b)]. Generally, results of the SAM evaluation algorithm applied to hyperspectral image analysis were highly correlated ($R^2 = 0.964$) with visually evaluated sod (data not shown). In all cases, the quality of classification strongly depended on the appropriate setting of ROIs. For this purpose, it is necessary to inspect the respective region of the image at the highest resolution.

3.3. Effects of Ear Development on Quality of Head-Blight Detection

The presented results indicate that during early ear development (starting from BBCH-stage 75), initial symptoms of infection can be eye-detected at 7 dai (Figure 7).

Figure 7. Time bar for the detection of head blight under indoor conditions.



Supervised classification of hyperspectral images in visual range identified first head blight symptoms at the same time. Most efficient classification of *Fusarium*-affected ears was possible in the BBCH-stage 75 to 77. With progressing maturation, the number of ears that could not be classified correctly largely increased. However, these limitations were also partially valid for CFA imaging. On the other hand, F_v/F_m -measurements detect symptoms of infection of ears earlier than visual rating and

hyperspectral imaging. In general, highest accuracy of detection of *Fusarium* infection may be achieved if two successive measurement dates were performed at the growth stage “medium milk” (grain content is milky, BBCH 71-77; dai 6 to 11).

4. Discussion

To the best of our knowledge, this is the first investigation on the combined application of chlorophyll fluorescence and hyperspectral imaging for the early *in vivo* detection of head blight disease in winter wheat. It could be convincingly shown that both methods can identify *Fusarium* infection of wheat ears non-invasively and with high reliability at a very early stage of disease.

Based on the physiology of photosynthesis, chlorophyll fluorescence imaging allowed detection of the initial phase of tissue damage. After the penetration of kernels by the mycelia, there are distinct cellular changes such as degeneration of cytoplasm and cell organelles, decomposition of the host's cell walls and deposition of material in vessel walls of the diseased ears [34]. Infection may lead to a complete inhibition of the metabolic activity, including a pronounced disturbance of photosynthetic performance. This can be easily identified by a rapid decline in the photochemical efficiency in the infected ears [24], even before visible chlorophyll degradation occurs.

Chlorophyll fluorescence imaging is a well-established effective tool to comprehensively assess the development and the effects of bacterial, fungal and viral infections on leaves of many crop plants (e.g., [8,23,35]). One topic of this study was to optimize both application of this technique and analysis of obtained results for rapid and early detection of head blight on wheat ears in laboratory and in field. To establish the level of infection of intact ears, the potential maximum photochemical efficiency of PSII (F_v/F_m) was applied. In contrast to the analysis of absolute F_v/F_m values, the statistical evaluation of its relative distribution in the entire image provided a successful approach for this purpose. The broadening of the overall distribution of F_v/F_m with developing infection closely reflected the increased number of diseased kernels per ear.

The analysis of the cumulative F_v/F_m allows an accurate evaluation of the changed distribution pattern. Considering a cumulative percentage at 0.3 as the differentiation threshold, levels of infection can be differentiated in 10%-steps. Hence, even from the sixth dai, infected and control plants could be effectively separated in laboratory experiments.

Using this approach, it could be shown that the fungi seriously affect photosynthetic performance and, thus, chlorophyll fluorescence at an early stage. This has also been reported by [8,36] for leaf pathogens. For instance, [8] found reduced F_v/F_0 -values two to three days before leaf rust and powdery mildew infection became visible on leaves of winter wheat.

In several studies, other image analysis approaches have been applied. Investigating yellow rust infection on wheat, [5] recorded fluorescence images at 550 and 690 nm. From the relative signal intensities at these two wavelengths, the authors built a disease index (f_G) and defined pixels exceeding the f_G value of 0.65 as “diseased”. For each leaf of Tulip Breaking Virus (TBV)-infected plants, [37] calculated mean and standard deviation in photochemical efficiency classes (0–1) of fluorescence images. With this procedure, they got higher error rates (31–46%) than found by [5] or obtained in the present study. Classifying infected or healthy ears by the cumulative F_v/F_m at 0.3, as used in this study, is the fastest method of analysis.

The current techniques of chlorophyll fluorescence imaging for identification of head blight in the field certainly need improvement. Due to their complex physiological nature [16], the fluorescence signals directly depend on the prevailing photosynthetic photon flux density. Hence, fluctuating light and direct exposure to sunlight must be avoided during measurements. Furthermore, before measurement of F_0 and F_m , plants need to be dark-adapted [5,17]. As shown in this study, these requirements can certainly be achieved.

Although the applied measuring system was developed for use in the laboratory, a suitable ($R^2 = 0.658$) correlation between fluorescence analysis and visible head blight inspection has been obtained under field conditions. The reduction of correlation quality may be due to the high subjectivity of visual rating. The scale applied for visual rating had a step size of 10%; therefore, the absolute rating error would be 10% in the worst case. Methodological problems with the FluorCam measurements could not be entirely excluded but can be largely minimised by proper handling of the system.

Furthermore, movement of ears, induced by strong wind during recording of the sequences of F_0 and F_m images, may result in non-overlapping frames of these two parameters. Therefore, overall recording time was reduced to 2 s. Nevertheless, peripheral areas of ears, which were influenced by wind, may have incorrectly low F_v/F_m . However, the resulting poorly observable marginal regions at the border area of the ROIs may be excluded from further data analysis. Also, incomplete, uneven shading in the measuring box occasionally provide another problem, leading to an overestimated basic fluorescence and, hence, erroneously low F_v .

Elimination of all identified outliers reduced the amount of analysable ears by one third. As a consequence, the degree of determination of the correlation between fluorescence analysis and visible disease inspection rose to $R^2 = 0.80$. This clearly indicates the high potential of chlorophyll fluorescence imaging for non-invasive disease detection after further improvement of measuring technique and protocols.

In case of hyperspectral imaging, the SAM classification algorithm used resulted in good and reliable detection of diseased ears. According to [32] SAM has a great potential for analysis in multi- and hyperspectral imaging. Nevertheless, the best classification method always depends on the complexity of the initial sets of data. To distinguish between *Fusarium*-infected and non-infected wheat ears, [38] evaluated RGB images with only three available channels and achieved better classification results by applying the Maximum-Likelihood-Method compared to the application of SAM. With increasing spectral information, other classification methods such as SAM [39], k-Nearest Neighbour, Decision Tree or Support Vector Machines [40] are certainly indispensable. However, basically improved imaging techniques, which allow reproducible and reliable data recording, may represent a necessary first step to optimize and, most important, automatize disease detection.

In general, hyperspectral images have a much higher information density than RGB. Hyperspectral image analysis is based on the entire spectral range investigated and it not only refers to three colour channels. Using spectral images (400–750 nm), [41] clearly separated different ripening stages of tomatoes, whereas application of RGB-images was not successful. In addition, the use of distinct ratios of different wavelengths for disease control and quality analysis has been widely reported [42–44]. In this context, to apply spectral imaging under field conditions, data gained by hyperspectral systems may be used to extract relevant wavelength ranges for rapid multispectral devices.

An important problem with the disease classification by spectral imaging is the choice of the correct stage of development; otherwise the results may be inaccurate. If the measurements start too early, floral residues (anthers) and sterile ears caused by growth disorders are classified as diseased. Hence, in initial phases of the present studies, the low level of infection (*ca.* 3%) classified by SAM on healthy ears (see Figure 6) was not based on head blight but reflected developmental disorders such as barren middle ears or tips. This means that damage other than that caused by *Fusarium*, were inevitably classified as diseased. Both types of damages could not be readily distinguished.

Classification results could, in some cases, be improved by either choosing different angle's radian specific to the respective object classes or by manually adjusting the angle's radian to lower values, e.g., to 0.05. However, such variations showed to be advantageous only for ears in the BBCH stages 89, because it also decreased the total number of classified pixel.

With the incipient ripeness, the spectra of healthy and diseased ears become more similar, which, again, leads to an increasing misclassification. Unclassified pixels clearly reflect the progressing degradation of chlorophyll during maturation, which occurred in healthy ears without the distinct spectral signature of infected kernels. In the classification procedure applied, such a class has not been specified but will be a next step of optimization. This has to be verified on the control plants which were free of a *Fusarium* infection.

Both methods investigated here are suitable for the detection of head blight. However, the next step to improve the accuracy of classification should be the dynamic combination of both methods and the addition of form and spot parameters, as proposed by [37]. A highly accurate classification is very important, because minimal levels of infection can lead to a contamination of major harvest lots with the poisonous mycotoxins of the *Fusarium*-fungi.

5. Conclusions

Laboratory as well as in-field measurements were performed to investigate the applicability of chlorophyll fluorescence and hyperspectral imaging for the detection of head blight. Under laboratory conditions, chlorophyll fluorescence imaging detects even very low levels of infection (*ca.* 5%) as early as 6 dai; visual classification is only possible beginning from 7 dai.

One single measurement enables a distinction between infected and healthy ears, provided the disease is sufficiently strong. However, two measurement dates are recommended to reliably detect even a minimal infestation and to eliminate possible errors of measurement. By the use of the cumulative Fv/Fm threshold of 0.3, the severities of infection can be detected with an accuracy of 10% under laboratory conditions. Under field conditions a differentiation between low (0–10%), medium (40–50%) and high (70–80% and 90%, respectively) level of infection can also be described with a linear model ($R^2 = 0.658$, RMSE = 17%). Yet, the accuracy may rise up to 80% after data pre-processing including the elimination of outliers.

The application of the SAM evaluation algorithm yielded relatively good classification results. Nevertheless, the number of unclassified pixels increased during ear development.

The correct growth stage for spectral measurements and classification is therefore very important. From the BBCH-stage 81 (beginning of ripening) on, a distinction between healthy and diseased ears by the methods discussed above is limited.

Acknowledgements

This study is a part of the ProSenso.net² research project “Sensor based technologies and integrated assessment models in the food production chains”, which is financially supported by the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF 0339992). We would like to thank H. Beuche and J. Intreß for their support and instruction on the laboratory hyperspectral device and B. Rodemann from the Julius-Kühn-Institute, Braunschweig, for providing the plant material.

References

1. Miedaner, T.; Schneider, B.; Geiger, H.H. Deoxynivalenol (DON) content and fusarium head blight resistance in segregating populations of winter rye and winter wheat. *Crop Sci.* **2003**, *43*, 519-526.
2. Thate, A.; Schumann, S.; Hanschmann, G.; Urban, Y. Auftreten von Ährenfusariosen und Mykotoxinen in Sachsen und Ergebnisse der Vor- und Nachernteuntersuchungen von Winterweizen 2007 (in German). *Nachrichtenbl. Dtsch. Pflanzenschutzdienst* **2008**, *60*, 117.
3. Oerke, E.C.; Steiner, U.; Dehne, H.W.; Lindenthal, M. Thermal imaging of cucumber leaves affected by downy mildew and environmental conditions. *J. Exp. Botany* **2006**, *57*, 2121-2132.
4. Castro, K.L.; Sanchez-Azofeifa, G.A. Changes in spectral properties, chlorophyll content and internal mesophyll structure of senescing *Populus balsamifera* and *Populus tremuloides* leaves. *Sensors* **2008**, *8*, 51-69.
5. Bravo, C.; Moshou, D.; Oberti, R.; West, J.; McCartney, A.; Bodria, L.; Ramon, H. Foliar disease detection in the field using optical sensor fusion. *Agr. Eng. Int. CIGR J. Sci. Res. Dev.* **2004**, *6*, Manuscript FP 04 008.
6. Larsolle, A.; Muhammed, H.H. Measuring crop status using multivariate analysis of hyperspectral field reflectance with application to disease severity and plant density. *Precis. Agr.* **2007**, *8*, 37-47.
7. Meroni, M.; Rossini, M.; Picchi, V.; Panigada, C.; Cogliati, S.; Nali, C.; Colombo, R. Assessing steady-state fluorescence and PRI from hyperspectral proximal sensing as early indicators of plant stress: The case of ozone exposure. *Sensors* **2008**, *8*, 1740-1754.
8. Kuckenberg, J.; Tartachnyk, I.; Noga, G. Temporal and spatial changes of chlorophyll fluorescence as a basis for early and precise detection of leaf rust and powdery mildew infections in wheat leaves. *Precis. Agr.* **2009**, *10*, 34-44.
9. Delwiche, S.R. Classification of scab- and other mold-damaged wheat kernels by near-infrared reflectance spectroscopy. *Trans. ASAE* **2003**, *46*, 731-738.
10. Sims, D.A.; Gamon, J.A. Estimation of vegetation water content and photosynthetic tissue area from spectral reflectance: A comparison of indices based on liquid water and chlorophyll absorption features. *Remote Sens. Environ.* **2003**, *84*, 526-537.
11. Polischuk, V.P.; Shadchina, T.M.; Kompanetz, T.I.; Budzanivskaya, I.G.; Boyko, A.L.; Sozinov, A.A. Changes in reflectance spectrum characteristic of *Nicotiana debneyi* plant under the influence of viral infection. *Arch. Phytopath. Pflanzenschutz* **1997**, *31*, 115-119.
12. Aldea, M.; Frank, T.D.; DeLucia, E.H. A method for quantitative analysis of spatially variable physiological processes across leaf surfaces. *Photosynth. Res.* **2006**, *90*, 161-172.

13. Franke, J.; Menz, G.; Oerke, E.C.; Rascher, U. Comparison of multi- and hyperspectral imaging data of leaf rust infected wheat plants. *Proc. SPIE* **2005**, doi:10.1117/12.626531.
14. Lorenzen, B.; Jensen, A. Changes in leaf spectral properties induced in barley by cereal powdery mildew. *Remote Sens. Environ.* **1989**, *27*, 201-209.
15. Muhammed, H.H.; Larsolle, A. Feature vector based analysis of hyperspectral crop reflectance data for discrimination and quantification of fungal disease severity in wheat. *Biosyst. Eng.* **2003**, *86*, 125-134.
16. Maxwell, K.; Johnson, G.N. Chlorophyll fluorescence—A practical guide. *J. Exp. Botany* **2000**, *51*, 659-668.
17. von Willert, D.J.; Matyssek, R.; Herppich, W.B. *Experimentelle Pflanzenökologie, Grundlagen und Anwendungen* (in German); Georg Thieme Verlag: Stuttgart, Germany, 1995.
18. Baker, N.R.; Rosenqvist, E. Application of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: An examination of future possibilities. *J. Exp. Botany* **2004**, *55*, 1607-1621.
19. Quilliam, R.S.; Swarbrick, P.J.; Scholes, J.D.; Rolfe, S.A. Imaging photosynthesis in wounded leaves of *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Botany* **2006**, *57*, 55-69.
20. Herppich, W.B. Application potential of chlorophyll fluorescence imaging analysis in horticultural research. In *Proceedings of the 6th International Symposium: Fruit, Nut and Vegetable Production Engineering*, Potsdam, Germany, 11–19 September 2001; pp. 609-614.
21. Herppich, W.B.; Linke, M.; Landahl, S.; Gzik, A. Preharvest and postharvest responses of radish to reduced water supply during growth. *Acta Horticult.* **2001**, *553*, 89-90.
22. Kuckenberg, J.; Tartachnyk, I.; Schmitz-Eiberger, M.; Noga, G. Early detection of leaf rust and powdery mildew infections on wheat leaves by PAM fluorescence imaging. *Precis. Agr.* **2007**, *8*, 515-521.
23. Daley, P.F. Chlorophyll fluorescence analysis and imaging in plant stress and disease. *Can. J. Plant Pathol.* **1995**, *17*, 167-173.
24. Bauriegel, E.; Giebel, A.; Herppich, W.B. Rapid *Fusarium* head blight detection on winter wheat ears using chlorophyll fluorescence imaging. *J. Appl. Botany Food Quality* **2010**, *83*, 196-203.
25. Bauriegel, E.; Giebel, A.; Geyer, M.; Schmidt, U.; Herppich, W.B. Early detection of *Fusarium* infection in wheat using hyper-spectral imaging. *Comput. Elect. Agr.* **2011**, in press, doi:10.1016/j.compag.2010.12.006.
26. Lancashire, P.D.; Bleiholder, H.; Vandenboom, T.; Langeluddeke, P.; Strauss, R.; Weber, E.; Witzemberger, A. A uniform decimal code for growth-stages of crops and weeds. *Ann. Appl. Biol.* **1991**, *119*, 561-601.
27. Walther, U.; Flath, K.; Moll, E.; Prochnow, J.; Sachs, E. Methodische Anleitung zur Bewertung der partiellen Resistenz von Sorten bzw. Linien unter Berücksichtigung epidemiologischer Aspekte (in German). *Mitt. Biol. Bundesanst. Land- Forstwirtschaft.* **2000**, *374*, 9-25.
28. Nedbal, L.; Trtilek, M.; Herppich, W.B. Methods and equipment for fluorescence imaging on plant material. *Bornimer Agrartechn. Ber.* **2000**, *25*, 127-135.
29. Schlüter, O.; Förster, J.; Geyer, M.; Knorr, D.; Herppich, W.B. Characterization of high-hydrostatic-pressure effects on fresh produce using chlorophyll fluorescence image analysis. *Food Bioprocess Tech.* **2009**, *2*, 291-299.
30. Krause, G.H.; Weis, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Ann. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.* **1991**, *42*, 313-349.

31. *ENVI User's Guide*; Research Systems, Inc.: Boulder, CO, USA, 2005; pp. 1-1202.
32. Petropoulos, G.P.; Vadrevu, K.P.; Xanthopoulos, G.; Karantounias, G.; Scholze, M. A comparison of spectral angle mapper and artificial neural network classifiers combined with Landsat TM imagery analysis for obtaining burnt area mapping. *Sensors* **2010**, *10*, 1967-1985.
33. University of Texas at Austin CSR. *Analysis of Hyperspectral Imagery*. Available online: www.csr.utexas.edu/projects/rs/hrs/analysis.html (accessed on 10 July 2010).
34. Kang, Z.; Buchenauer, H. A cytological and ultrastructural study on the infection process of *Fusarium culmorum* on wheat spikes. *Mycol. Res.* **2000**, *104*, 1083-1093.
35. Scholes, J.D.; Rolfe, S.A. Photosynthesis in localised regions of oat leaves infected with crown rust (*Puccinia coronata*): Quantitative imaging of chlorophyll fluorescence. *Planta* **1996**, *199*, 573-582.
36. Förschler, A.; Portz, C.; Steiner, U.; Schmitz-Eiberger, M.; Noga, G. *Minderung von pilzlichem Pathogenbefall im organischen Obstbau durch Zufuhr von Antioxidantien (in German)*; Landwirtschaftliche Fakultät der Universität Bonn, Schriftenreihe des Lehr- und Forschungsschwerpunktes USL 113: Bonn, Germany, 2003; pp. 1-41.
37. Polder, G.; van der Heijden, G.W.A.M.; van Doorn, J.; van der Schoor, R.; Baltissen, A.H.M.C. Detection of the tulip breaking virus (TBV) in tulip using spectral and vision sensors. In *Proceedings of the 7th European Conference on Precision Agriculture*, Wageningen, The Netherlands, 6-8 July 2009; pp. 219-227.
38. Hehmke, M.; Dammer, K.H.; Herppich, W.B.; Hellebrand, J.; Beuche, H.; Rodemann, B. Digital image analysis for detection of head blight (*Fusarium spp.*) in winter wheat. In *Proceedings of the International Symposium: Agricultural Field Trials—Today and Tomorrow*, Stuttgart, Germany, 8-10 October 2007; pp. 56-61.
39. ENVI Tutorial. *Selected Hyperspectral Methods*. Available online: www.creaso.com (accessed on 7 January 2010).
40. Weis, M.; Rumpf, T.; Gerhards, R.; Plümer, L. Comparison of different classification algorithms for weed detection from images based on shape parameters. *Bornimer Agrartechn. Ber.* **2009**, *69*, 53-64.
41. Polder, G.; van der Heijden, G.W.A.M.; Young, I.T. Spectral image analysis for measuring ripeness of tomatoes. *Trans. ASAE* **2002**, *45*, 1155-1161.
42. Gitelson, A.A.; Gritz, Y.; Merzlyak, M.N. Relationships between leaf chlorophyll content and spectral reflectance and algorithms for non-destructive chlorophyll assessment in higher plant leaves. *J. Plant Phys.* **2003**, *160*, 271-282.
43. Lichtenthaler, H.K. Spektroskopische Eigenschaften von Pflanzen und ihre Nutzung zur Fernerkundung der Vegetation (in German). *Fridericiana* **1994**, *49*, 25-45.
44. Nicotra, A.B.; Hofmann, M.; Siebke, K.; Ball, M.C. Spatial patterning of pigmentation in evergreen leaves in response to freezing stress. *Plant Cell Environ.* **2003**, *26*, 1893-1904.

3.4 Detection of head blight (*Fusarium* spp.) at ears of winter wheat using hyperspectral and chlorophyll fluorescence imaging

Dieser Artikel wurde als Proceedingbeitrag zur Tagung „Joint International Agricultural Conference“ verfasst und stellte erstmals die Ergebnisse dar. Hauptaugenmerk bei der Hyperspektralanalyse ist die Verwendung des 'Spectral Angle Mapper'. Die Detektion der Partiellen Taubähigkeit gelingt im Stadium BBCH 75 mittels der CFA.

BAURIEGEL, E., BEUCHE, H., DAMMER, K.H., GIEBEL, A., HERPPICH, W.B., INTREß, J., RODEMANN, B. (2009): Detection of head blight (*Fusarium* spp.) at ears of winter wheat using hyperspectral and chlorophyll fluorescence imaging. In: E.J. VAN HENTEN, D. GOENSE and C. LOKHORST (eds.), Precision agriculture '09. Proceedings of the Joint International Agricultural Conference. Wageningen: Academic Publishers, S. 203-210.

Determination of head blight on ears of winter wheat by means of hyperspectral and chlorophyll fluorescence image analysis

Elke Bauriegel¹, Horst Beuche¹, Karl-Heinz Dammer¹, Antje Giebel¹, Werner B. Herppich¹, Joachim Intreß¹, Bernd Rodemann²

¹ *Leibniz Institute for Agricultural Engineering Potsdam-Bornim, Max-Eyth-Allee 100, D-14469 Potsdam, Germany*

² *Federal Research Centre for Cultivated Plants – Julius Kühn-Institut, Messeweg 11/12, D-38104 Braunschweig, Germany*

ebauriegel@atb-potsdam.de

New regulations for critical values of the *Fusarium* toxins in cereals and cereal products have been implemented in the European Union since 2005. For selective mycotoxin analyses of cereals information about the status of infestation in the field would be helpful. Therefore, early detection of disease symptoms directly on the ears together with the corresponding geographic position will become highly important for selective harvest. In this project various digital imaging methods were tested for their ability to detect head blight disease on winter wheat.

For hyperspectral imaging a laboratory system was developed. Time series of images of healthy and artificially *Fusarium*-infected ears were recorded within the wavelength range of 400 nm to 1000 nm. The image analysis software ENVI was applied to define disease specific spectral signatures. Applying ‘Spectral Angle Mapper’ as an appropriate method for classification healthy and diseased ear tissue could be clearly distinguished.

Simultaneous to hyperspectral imaging chlorophyll fluorescence imaging of healthy and *Fusarium*-infected ears, and visual rating of the degree of infection was performed. Using the FluorCam 690 MF the photosynthetic efficiency was measured to determine the effect of disease on photosynthesis. A decrease of photosynthetic efficiency of diseased compared to healthy ears was observed between six and eleven days after artificial inoculation. The severity of disease symptoms was correlated with the photosynthetic efficiency.

Chlorophyll image analysis reliably detects diseased ears at a limit of 5 %. A differentiation of 10 % steps up to 10 % severity of disease degree succeeded. Hyperspectral image analyses very exactly detect head blight after 7 days after inoculation up to a degree of disease of 50 %. The result strongly depends on the quality of chosen region of interests (ROI). From the beginning of ripening

(growth stage 81) the possibility to distinguish between healthy and diseased ears is very limited with the evaluated methods.

Keywords: discrimination, early recognition, *Fusarium culmorum*, photosynthetic efficiency, sensors

Introduction

Many species of the *Fusarium*-fungus can cause head blight on wheat (Edwards *et al.* 2001, Schlüter *et al.* 2006), which leads to crop loss and to contamination of the reaped grains with mycotoxins (trichothecenes), mainly deoxynivalenol (DON) and 3-acetyl DON (3-ADON) (Miedaner *et al.* 2003). Since June 2005 new ordinances have been brought into effect for limiting values for the *Fusarium* toxins deoxynivalenol, zearalenon and fumonisin in grains and cereal products within the European Union (Ordinance (EG) Nr. 856/2005 in the European Union, June 2005). To enforce this directive for controlling the critical values of the *Fusarium* toxins, efforts are made to consider existent methods and to develop better sensors for checking the mycotoxin using new technical know how. An automatic identification of head blight on wheat ears would be a first step towards a directed exclusion of affected field areas.

In conventional agriculture the wheat plants can be treated only preventively against a *Fusarium* infection until close to the start of bloom. Whether field areas are really affected can be estimated with time consuming and expensive pre- and post-harvest laboratory tests (serological rapid tests, Fast-DON-ELISA-test, counting method; Thate *et al.* 2008). Thus, the ability to identify the disease right in the field using less complex methods would allow the farmers to harvest healthy grain in the future. Storage of contaminated lots of grain could be prevented, and finally, consumers and producers of feeding stuff could benefit from receiving less toxin-burdened grain.

Image analysis methods are suitable for the identification of diseases in the field, because they can rapidly, effectively and contactlessly determine the (externally visible) state of health of the plants. For instance, spectral measurement systems are used to diagnose viral infections (Polischuk *et al.* 1997) and to identify temporal and spatial variabilities of crop canopies (Zbell 2007). Hyperspectral imaging has already been used to detect fungal based grain diseases (Franke *et al.* 2005, Lorenzen and Jensen 1989, Muhammed and Larsolle 2003). Furthermore, Bravo *et al.* (2004) could finally improve the discrimination of yellow rust on

winter wheat to an accuracy of 94-95 % by the combination of chlorophyll fluorescence and hyperspectral reflection measurement.

On the other hand, chlorophyll fluorescence analysis does not only measure the externally visible effects on diseased plants. Instead it provides comprehensive information about the potential and the actual activity of photosynthesis (von Willert *et al.* 1995), which is often considerably reduced in stressed or affected plants. Thus, symptoms of a disease can be detected with this method at a very early stage. Nowadays, the chlorophyll fluorescence analysis has already been universally applied, for instance for the evaluation of the vitality of plant tissues (Herppich 2002, Herppich *et al.* 2001, Forstreuter *et al.* 2006), diseases like rust leaf on cereals (Kuckenberg *et al.* 2007) or the affection by the tobacco mosaic virus (Daley 1995).

Therefore, both methods seem to be predestined for the detection of head blight. In a laboratory experiment these two imaging methods were compared to find out which one detects head blight earliest. Furthermore, several questions should be answered. 1) How exactly and in what time frame can head blight be detected generally? 2) Are there differences in the accuracy of the detection with different degrees of disease?

Materials and methods

Materials and experimental design

In eight pots (18 cm x 18 cm) 16 grains per pot (four control pots and four infected pots, respectively) were sown and after germination wheat plants (cultivar 'Taifun') were cultivated in green house. Plants were inoculated with a germ mixture of the phylum *Fusarium culmorum* at a spore-density of 250 000 spores per ml on three successive days after beginning of blooming. To guarantee the spread of germs plants were kept at 20 ± 2 °C, high humidity (70 %) and an illumination period of 12 hours (high-pressure sodium-vapour lamps, SON-T Plus 400 W, Philips GmbH, Hamburg, Germany). Measurements started immediately after inoculation.

Rating of the laboratory plants were performed three times a week. Developmental stages of ears were graded according to the BBCH scale, the percental affection of the ears was estimated according to Walther *et al.* (2000). All measurements were performed on whole-plant level.

Chlorophyll fluorescence imaging

Chlorophyll fluorescence imaging was performed with a modular system (FluorCAM 640MF, PSI, Brno, Czech Republic) measuring sequences of fluorescence images with an user-defined timing of set points, measurements intervals and irradiance (Nedbal *et al.* 2000a, Herppich 2001, 2002). Basic fluorescence F_0 was induced by two sets of 345 super-bright orange light emitting diodes ($\lambda_{\text{max}} = 620 \text{ nm}$). Photosynthesis was driven by continuous actinic irradiation provided by the LED panels. Maximum fluorescence (F_m) was measured by short-term (1 s) closure of photosystem II as induced by saturation light pulses (max. $2500 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) generated by a electronic shutter-equipped halogen lamp (250 W). The ratio F_v/F_m ($F_v = F_m - F_0 = \text{variable fluorescence}$) is an indicator of the potential maximum photochemical efficiency, and, thus, a valuable tool to determine both capacity and stability of photosynthesis (von Willert *et al.* 1995). A CCD camera with a F1.2/2.8-6 mm objective and a short-pass filter recorded fluorescence images (12-bit, 512×512 pixel; maximal frequency 50 images s^{-1}) synchronously with the weak, non-actinic measuring-light pulses. The system was controlled by the FluorCam 6 software (PSI, Brno, Czech Republic). All measurements were performed on dark-adapted plants (6 ears per treatment) before the start of the artificial lighting.

Hyperspectral imaging

The laboratory hyperspectral imaging device recorded reflection spectra in a wavelength range of 400 to 1000 nm with a spectral resolution of 2.5 nm. The system comprises the spectrograph (ImSpector V10E, Spectral Imaging Ltd., Oulu, Finland), the b/w camera (Pixelfly qe, PCO AG, Kelheim, Germany), an accessory rotating mirror with microstep motor and the software HyBiS 1.0. The hyperspectral camera stores the spectra of all pixels of an image line by line. HyBiS 1.0, developed under LabView 8.2 (National Instruments Corporation, Austin, USA), is used to control the camera system, for data pre-processing, including the black/white calibration of the spectra. The samples were illuminated with a stabilised halogen lamp of 150W. The same six ears per variant used for chlorophyll fluorescence analysis were also examined by hyperspectral imaging with a time lag of approximately two days during a period of three weeks.

Data analysis

The classification of diseased and healthy areas was performed with the evaluation software ENVI (Research Systems Inc., Boulder, CO, USA) by means of monitored classifications in the evaluation algorithm „spectral angle mapper“.

For this purpose regions of interests (ROIs) were established as the bases for the classification according to the two classes diseased and healthy. After classification the relative portions of pixels per image belonging to the healthy, diseased and unclassified object classes were determined.

Results

Table 1 gives an overview over the development of diseased plants regarding days after inoculation (dai), BBCH state and degree of disease. First symptoms appears in the BBCH state 71/75, first ripening symptoms developed in the BBCH state 81.

Table 1: Development of plants and disease symptoms of head blight

dai	5	7	9	11	14	16	18	21	23	25
BBCH state	65/71	71/75	75	75/77	77/79	79/81	79/81	81/85	85	89
Rating in % (n=6)	0	3	5	6	9	16	19	60	82	90

Chlorophyll fluorescence imaging

Ears with a degree of disease between 2 and 100 % were evaluated. Under optimal conditions the maximum F_v/F_m -value of healthy, intact plant parts may be 0.84. Fluorescence imaging very well distinguished between diseased and healthy tissue areas at the stage BBCH 75 (medium milk). In very weakly diseased ears (2 %) values of photosynthetic efficiency concentrated in high efficiency classes (Figure 1A), in stronger diseased ears (50 %) the distribution of F_v/F_m broadened (Figure 1B) due to the coexistence of both healthy and diseased tissues. As expected, the distribution of values of photosynthetic efficiency of control plants and very weakly diseased ears is nearly identical (Figures 1A).

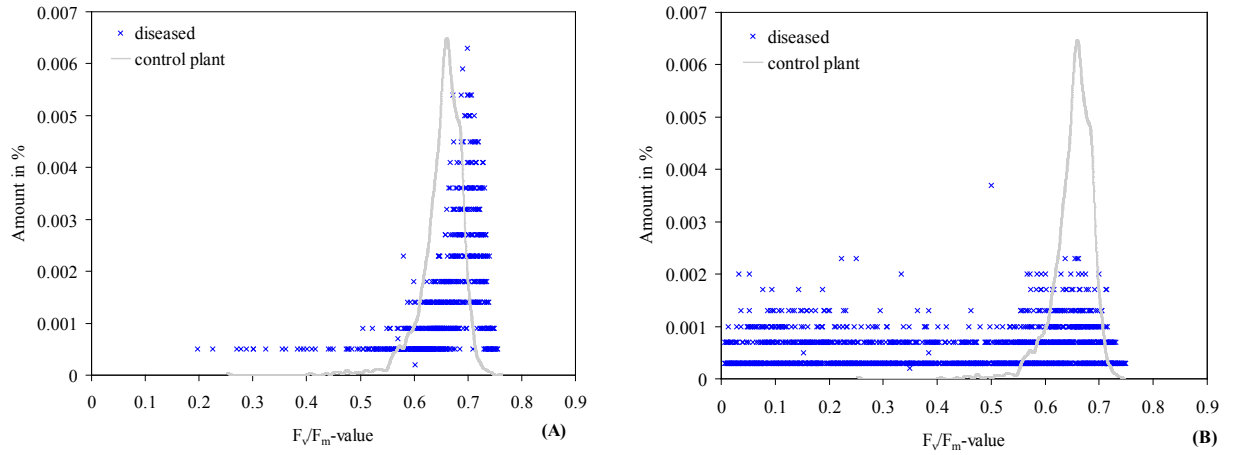


Figure 1: Pixel distribution of the maximum photochemical efficacy (F_v/F_m) of weakly (2 %) (A) and strongly diseased (50 %) wheat ears (B).

For a further evaluation and derivation of the degree of disease all F_v/F_m -values were cumulated and classified into classes (step size 0.05) and cumulatively depicted in the graph (Figure 2). 80 % of the F_v/F_m -values of weakly diseased ears (2-3 % affection) concentrated in the high photosynthesis efficiency classes (>0.6), only few could be found in the lower-efficiency classes. In contrast, in strongly diseased ears cumulated F_v/F_m -values obtained only low efficiency classes (<0.3). In moderately diseased ears (40-60 %), comprising both photosynthetically active and inactive areas, approximately 40 % of all cumulative F_v/F_m -values accumulated in low efficiency classes (<0.3). Hence, an efficiency value of 0.3 seems to be a relevant threshold to differentiate diseased and healthy ears.

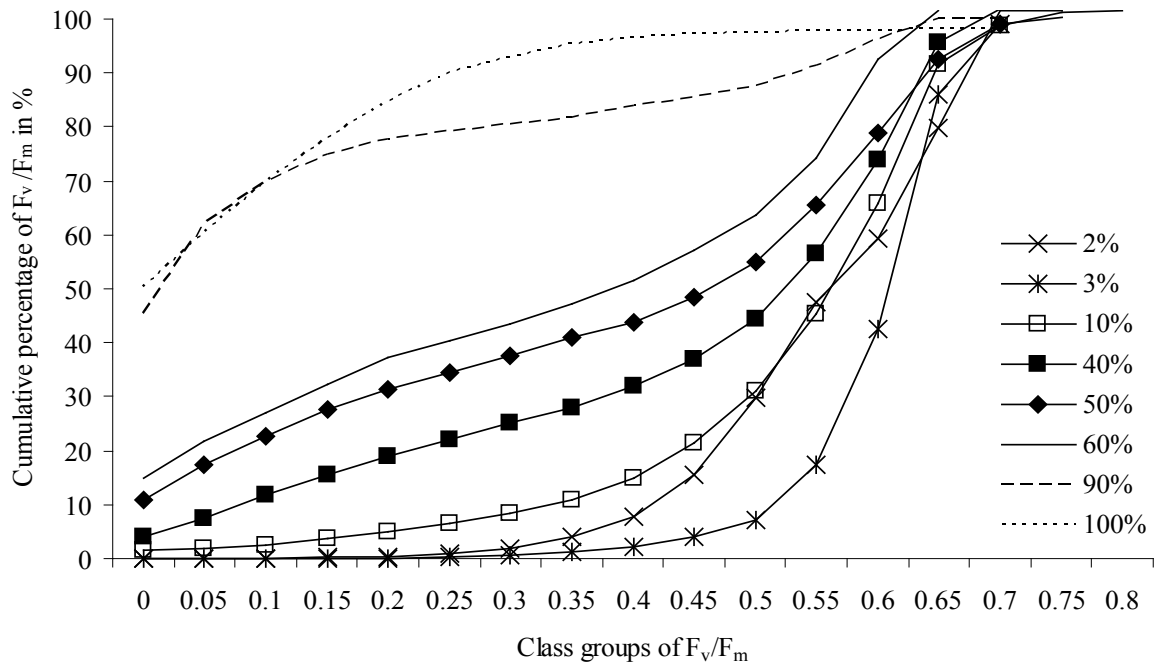


Figure 2: Differentiation of the degrees of infection: cumulative percentage of F_v/F_m -values (%) of ears, diseased to a different degree (3-100%, per degree $n=3$).

The cumulative photosynthetic efficiency overlapped in the disease classes 2 % and 10 %. This means that results from visual rating and chlorophyll fluorescence were not completely identical. This may be due to the high subjectivity of visually rating of the degree of disease. The scale applied has a step size of 10 %; therefore the absolute rating error would be 10 % in the worst case. Methodological problems with the FluorCam measurements could not be entirely excluded but can be largely minimised by proper handling of the system. As chlorophyll fluorescence measurements are susceptible to changes in irradiation intensity, complete illumination of the object is essential. However, poorly observable marginal areas at the border area of the ROIs can be excluded from further data analysis.

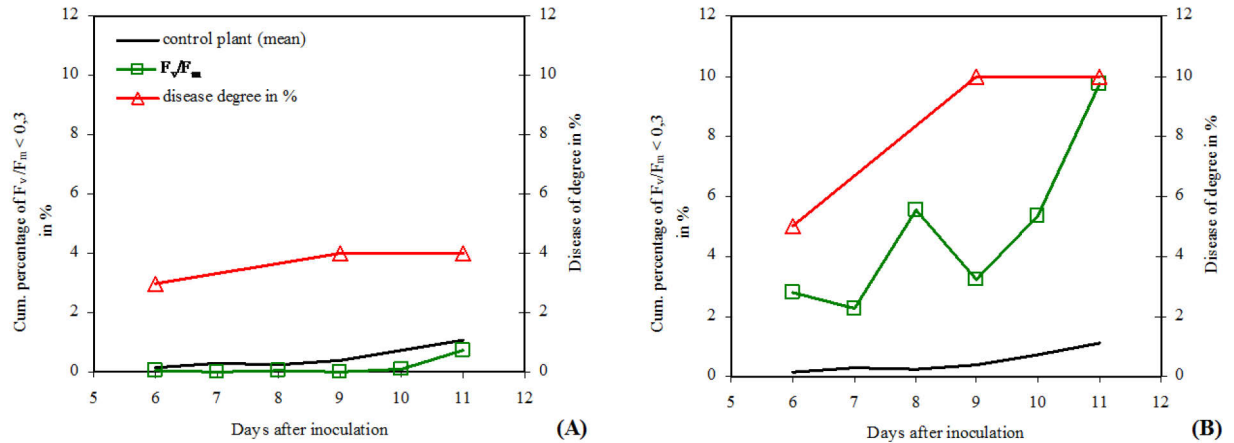


Figure 3: Cumulative percentage of F_v/F_m values larger than 0.3 of controls (line) and diseased plants (squares) and the degree of disease (% , triangles) with weakly (A) and with strongly infected ears (B).

In a time series study starting one day after inoculation weakly (Figure 3A) and strongly infected ears (Figure 3B) could easily be differentiated by analysing the accumulation of F_v/F_m -in the classes with values below 0.3. With chlorophyll image analysis it was possible to reliably detect diseased ears from a degree of disease of 5 % on (Figure 3B). The cumulative proportion of low efficiency classes was found 3 % above the control value even at the first day of measurement and rose to 10 % within one week. Up to a degree of disease of 4 % F_v/F_m of diseased and control ears did not differ. Even with a degree of disease of 10 % plants showed only minor visible symptoms of head blight after one week. Despite the high detection limit of the degree of disease of 5 % and the need to eliminate inaccuracies of measurement two measurement dates (6th and 11th day) yielded a reliable determination of the disease.

Hyperspectral measurement

For analysis of the hyperspectral images the SAM classification algorithm was chosen because it is insusceptible to variations of illumination. The classification results of the degrees of disease obtained from hyperspectral imaging nicely corresponded to those of the visual rating (Figure 4). In the initial 14 days after inoculation (dai) the classification results were slightly higher than the rated degrees of disease; from the beginning of the ripening 16 dai they were slightly

lower. The ear damages rated in the initial phase (up to 3 %) were not based on head blight but reflect developmental disorders like barren middle ears or tips. Those damages were classified as diseased by hyperspectral imaging. Head blight was also very well separated from the healthy class after ripening has begun (from BBCH 81). Pixels, which previously were classified as healthy, remain unclassified now.

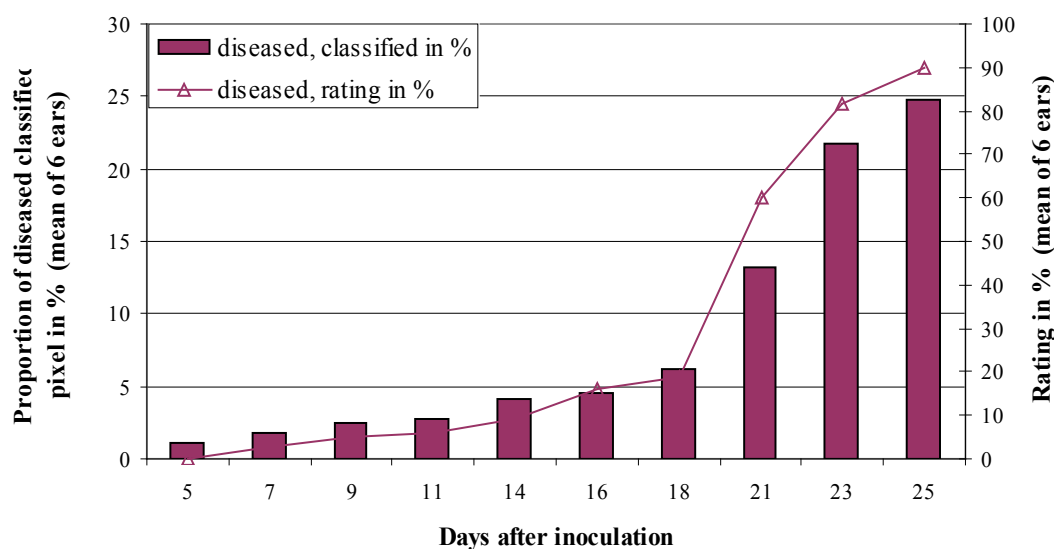


Figure 4: Comparison of degree of head blight obtained by visual rating and classified from hyperspectral images (means of 6 ears).

Nine days after inoculation control plants (not shown) were 98 % classified as healthy and 94 % 14 days after inoculation. The still adhering anthers and the damages caused by development were classified as diseased. This forms the “basic burden“ of damages, which appeared independently from head blight on the plants under indoor conditions. With further ripening there appeared more areas of the ear, which remain unclassified (4 % 14 dai).

Diseased ears with head blight symptoms could be identified using supervised classification with the SAM algorithm up to BBCH-stage 75 (7 dai). Damages not caused by *Fusarium* were also classified as diseased. Both damages could not be distinguished. In the BBCH-stage 77 to 79 it was possible to gain a good classification of ears being affected with head blight without additional “basic damages”. The evaluation of the classification in advanced stages of development is not yet fully completed.

Conclusion

After an infection it is possible to determine the disease on the 6th and 11th day after infection, respectively, by chlorophyll fluorescence image analysis. Although only one measurement may allow discriminating between healthy and sufficiently affected diseased ears, we suggest two measurement dates to reliably determine even low affections and to possibly exclude measuring errors. Hyperspectral imaging and following supervised classification (SAM) can identify diseased ears. The best period is in the BBCH-stage 77 to 79. The image analysing detection of head blight can be applied to determine diseased sections early and, depending on the severity, to harvest them separately. From the beginning of ripening at the growth stage 81 on, there is an only very limited possibility to distinguish between healthy and diseased ears with the evaluated methods.

Acknowledgement

This study is a part of the ProSenso.net² research project “Sensor based technologies and integrated assessment models in the food production chains”, which is financially supported by the German Federal Ministry of Education and research (BMBF 0339992).

References

- Bravo, C., D. Moshou, R. Oberti, J. West, A. McCartney, L. Bodria and Ramon, H., 2004. Foliar disease detection in the field using optical sensor fusion. *Agricultural Engineering International: the CIGR Journal of scientific research and development*. Manuscript FP 04 008. Vol. 6, 14 p.
- Daley, P. F., 1995. Chlorophyll fluorescence analysis and imaging in plant stress and disease. *Canadian Journal of plant pathology* 17: 167-173.
- Edwards, S.G., Pirgozliev, S.R., Hare M.C. and Jenkinson, P., 2001. Quantification of trichothecene-producing *Fusarium* species in harvested grain by competitive PCR to determine efficacies of fungicides against fusarium head blight of winter wheat. *Applied Environmental Microbiology* 67 (4): 1575-1580.

Forstreuter, M., Schröder, R. and Herppich, W. B., 2006. Chlorophyllfluoreszenzbildanalyse zur raschen Indikation des Befalls von Laub- und Nadelbäumen durch herbivore Insekten. (Chlorophyll fluorescence image analysis for rapid indication of the infestation of broad-leaved trees and conifers by herbivore insects). Bornimer Agrartechnische Berichte 56: 26-33.

Franke, J., Menz, G., Oerke, E.-C. and Rascher, U., 2005. Comparison of multi- and hyperspectral imaging data of leaf rust infected wheat plants. Remote sensing for agriculture, ecosystems and hydrology VII. Owe, M. and D'Urso, G. (eds): Proceeding of SPIE Vol. 5976, 59761D, pp. 11.

Herppich, W. B., 2002. Application potential of chlorophyll fluorescence imaging analysis in horticultural research. In: Zude, M., Herold, B. and Geyer, M. (eds.) Fruit, Nut and Vegetable Production Engineering. Proceedings of the 6th International Symposium. Institut für Agrartechnik Bornim e.V., Potsdam, pp. 609-614.

Herppich, W. B., Linke, M., Landahl, S. and Gzik, A., 2001. Preharvest and postharvest responses of radish to reduced water supply during growth. Acta Horticulture 553 (1): 89-90.

Kuckenberg, J., Tartachnyk, I., Schmitz-Eiberger, M. and Noga, G., 2007. Early detection of leaf rust and powdery mildew infections on wheat leaves by PAM fluorescence imaging. Precision agriculture 8: 515-521.

Lorenzen, B. and Jensen, A., 1989. Changes in leaf spectral properties induced in barley by cereal powdery mildew. Remote sensing of environment 27: 201-209

Miedaner, T., Schneider B. and Geiger H. H., 2003. Deoxynivalenol (DON) content and fusarium head blight resistance in segregating populations of winter rye and winter wheat. Crop Science 43 (2): 519-526.

Muhammed, H. H. and Larsolle, A., 2003. Feature vector based analysis of hyperspectral crop reflectance data for discrimination and quantification of fungal disease severity in wheat. Biosystems Engineering 86(2): 125-134.

Nedbal, L., Trtilek, M. and Herppich, W. B., 2000. Methods and equipment for fluorescence imaging on plant material. Bornimer Agrartechnische Berichte 25: 127-135.

Ordinance (EG) Nr. 856/2005 in the European Union, 2005. Available at: http://www.lgl.bayern.de/lebensmittel/rueckstaende/mykotoxine_hoehstmengengeruegelung.htm#verordnungen. Accessed 7 January 2009.

Polischuk, V. P., Shadchina, T. M., Kompanetz, T. I., Budzanivskaya, I. G., Boyko, A. L. and Sozinov, A. A., 1997. Changes in reflectance spectrum characteristic of *Nicotiana debneyi* plant under the influence of viral infection. Archiv Phytopathologie und Pflanzenschutz 31: 115-119.

Schlüter, K., Kropf, U., Karlovsky, P., 2006. Untersuchungen zur systemischen Infektion von *Fusarium culmorum* an Winterweizen in Schleswig-Holstein (Research into systemic infection of *Fusarium culmorum* on winter wheat in Schleswig-Holstein). Gesunde Pflanzen 58: 107-116.

Thate, A., Schumann, S., Hanschmann, G. and Urban, Y., 2008. Auftreten von Ährenfusariosen und Mykotoxinen in Sachsen und Ergebnisse der Vor- und Nachernteuntersuchungen von Winterweizen 2007 (Appearance of ear fusariosis and mycotoxins in Saxony and results of pre- and postharvest tests of winter wheat 2007). Nachrichtenblatt Deutscher Pflanzenschutzdienst 60: 117pp.

von Willert, D.J.; Matyssek, R. and Herppich, W. B., 1995. Experimentelle Pflanzenökologie, Grundlagen und Anwendungen (Experimental plant ecology. Basics and applications). Georg Thieme Verlag, Stuttgart: 344 pp.

Walther, U., Flath, K., Moll, E., Prochnow, J. and Sachs, E., 2000. Methodische Anleitung zur Bewertung der partiellen Resistenz von Sorten bzw. Linien unter Berücksichtigung epidemiologischer Aspekte (Methodological instruction to the assessment of partial resistance of species and lines respectively considering epidemiological aspects). Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft 374: 9-25pp.

Zbell, B., 2006. Ein multivariates statistisches Verfahren zur direkten Klassifizierung von Kulturpflanzenarten aus Reflexionsdaten von Feldspektromettermessungen im Gelände (A multivariate statistical method for the direct classification of crop species with reflection data of field spectrometer measurements in field). In: Wenkel, K.-O., Wagner, P., Morgenstern, M., Luzi, K. and Eisermann, P. (eds.). Land- und Ernährungswirtschaft im Wandel – Aufgaben und Herausforderungen für die Agrar- und Umweltinformatik, Proceedings of GIL-Jahrestagung, 6.-8.March 2006 pp.321-324.

3.5 Einfluss der Reife auf die maximale photochemische Effizienz (F_v/F_m)

Bei einsetzender Reife der Ährchen und dem damit verbundenen generellen Chlorophyllabbau sinkt der Wert von F_v/F_m . Der kumulative Anteil von F_v/F_m bei 0,3 kann demzufolge auch nur infizierte und Kontrollpflanzen unterscheiden, wenn die Pflanze noch nicht in der Reifephase ist. Damit ist dieser Parameter ab BBCH 79 nicht mehr für eine Früherkennung der Fusariose geeignet (Abb. 13).

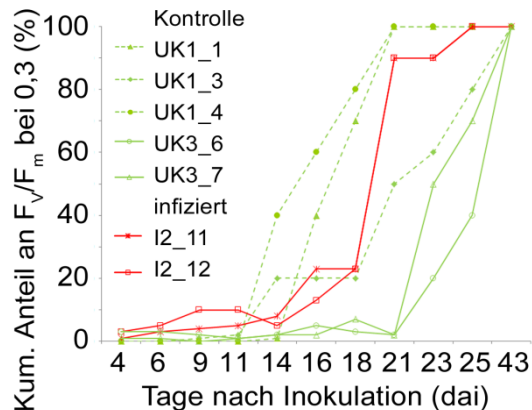


Abbildung 13: Kumulative Anteile von F_v/F_m bei 0,3 (in %) bei vorzeitig gereiften Kontrollpflanzen (UK1-1, UK1-3, UK1-4; grüne, unterbrochene Linien), an *Fusarium* erkrankten Weizenpflanzen (I2-11, I2-12, rote Linien) und Kontrollpflanzen mit normalem Entwicklungsverlauf und beginnender Reife ab 21. dai.

Zwischen Inokulation (durchgeführt in BBCH 61) und Reife verbleiben meist 21 Tage, ehe sich der Chlorophyllabbau durch Reife im Parameter F_v/F_m deutlich auswirkt. Erste Anzeichen einer leichten Beeinflussung durch Reifeprozesse sind 16 Tage nach Inokulation zu beobachten.

In dem Zeitreihenexperiment war die Detektion mittels CFA nur bis zum dai 11 sinnvoll, weil drei Kontrollpflanzen offensichtlich aus einer zeitigeren Aussaatcharge kamen und eher abreifen. Dies zeigt der vorzeitige Anstieg des kumulativen Anteils von F_v/F_m bei 0,3 bei den drei Kontrollpflanzen UK1-1, UK1-3 und UK1-4 (grüne, unterbrochene Linien). Die anderen Kontrollpflanzen zeigten erwartungsgemäß erst am 23 dai einen sehr starken Anstieg des kumulativen Anteils von F_v/F_m bei 0,3 durch Reife. Trotzdem bleiben die kumulativen Anteile der normal abreifenden Kontrollen zwischen dem 21. dai und 25. dai unter denen der infizierten Pflanzen. Grund hierfür ist der verstärkte Chlorophyllabbau durch zwei Komponenten: durch die Fusariumpilzschädigung und Reife. Erst bei vollständigem Chlorophyllabbau - erreicht im BBCH 89 (43 dai) - sind die F_v/F_m -Werte in beiden Gruppen, also bei den infizierten als auch gesunden Pflanzen, zu 100% im Bereich bis 0,3.

3.6 Detektionsgenauigkeit der Hyperspektralaufnahmen

Der gegensätzliche Verlauf der als gesund und krank klassifizierten Pixel bildet sehr gut den Krankheitsfortschritt ab. Dennoch steigt der Anteil der unklassifizierten Pixel mit Weiterentwicklung der Ähren (Abb. 14).

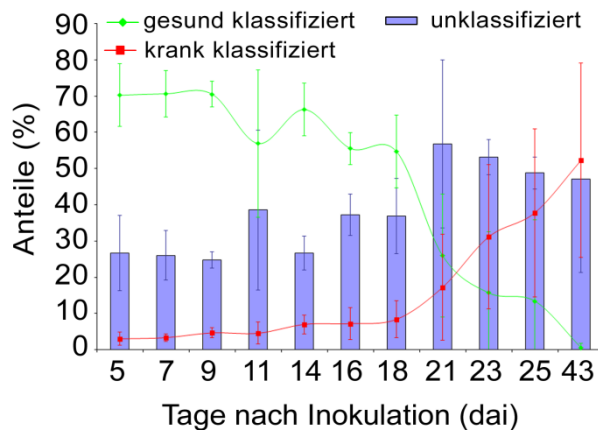


Abbildung 14: Anteil der unklassifizierten Pixel steigt im Zeitverlauf. Klassifizierung des Versuches 2 mit SAM (Threshold 0,1; Maskensetzung; n=3, am Beispiel I1 A1_9_10).

Die zunehmende Verschlechterung der Klassifikationsresultate lässt sich anhand der Residuen (Positiv-/Negativabweichungen) zwischen bonitiertem und klassifiziertem Befall beobachten (Abb. 15). Mit zunehmender Reife der Ährchen wird immer mehr Chlorophyll abgebaut. Damit passen die vorgegebenen Pixel-Farbwerte der gesetzten ROIs bzw. der Spektren nicht mehr exakt. Diese „Problemzonen“ sind hellgrün für die Zeitspanne BBCH 77/79 bis BBCH 81/85 bzw. dunkelgrün für BBCH 85 bis 89 unterlegt.

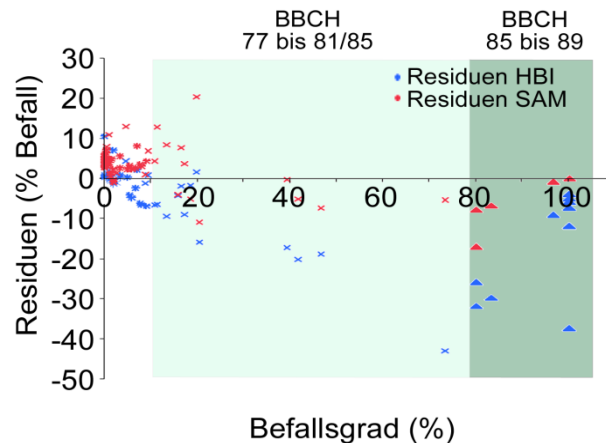


Abbildung 15: Zunahme der Abweichungen zwischen bonitiertem und klassifiziertem Befall bei fortschreitender Reife (BBCH 77/79 hellgrün, BBCH 85 bis 89 dunkelgrün unterlegt) sowohl für Kontroll- als auch infizierte Pflanzen, Daten aus zwei Zeitreihenversuchen.

Die Zunahme der Abweichungen betrifft sowohl die HBI- als auch SAM-Methode. Bei genauerer Betrachtung der mittleren absoluten Abweichungen der Residuen für die einzelnen BBCH-Zeitspannen (Tab. 4), zeigte sich aber, dass der richtige Aufnahmezeitpunkt beim HBI-Index besonders wichtig ist. Bis zum BBCH 75/77 ist er

sogar etwas besser als die SAM-Klassifikationsmethode (mittlere absolute Abweichung der Residuen bei HBI 2,2% Befall und bei SAM 3,9% Befall). Zwischen BBCH 77 bis 81/85 weicht dann schon der klassifizierte Befallsgrad mittels HBI um 9,9% Befall (HBI) und 8,0% Befall ab.

Wird das richtige Zeitfenster verpasst und handelt es sich um reife Ähren, so kann der Befall 20,9% mittels HBI-Index unter- bzw. überschätzt sein. Eine eindeutige Erkennung ist in diesem Zeitfenster stark eingeschränkt.

Tabelle 4: Mittlere absolute Abweichungen der Residuen bei den beiden Klassifikationsmethoden SAM und HBI bei unterschiedlichen Aufnahmezeitspannen

Gruppe	BBCH-Spanne	HBI (mittlere absolute Abweichung der Residuen, % Befall)	SAM (mittlere absolute Abweichung der Residuen, % Befall)	Anzahl der ausgewerteten Aufnahmen
1	65 bis 75/77	2,2	3,9	35
2	77 bis 81/85	9,9	8,0	19
3	85 bis 89	20,9	4,0	10

3.7 Bestimmung des DON-Gehaltes

Die künstliche Infektionssetzung war in den Versuchen erfolgreich. Die unbehandelten Kontrollproben weisen keinen bzw. nur einen vernachlässigbar geringen DON-Gehalt auf, wohingegen die künstlich infizierten Proben deutlich DON-belastet sind (Tab. 5 und 6). Erwartungsgemäß überschreiten die infizierten Pflanzen damit den EU-Höchstgehalt für DON bei unverarbeitetem Getreide von 1250 µg/kg.

Tabelle 5: Mittlere DON-Gehalte der Körner der untersuchten Probenklassen aus dem Zeitreihenversuch im März 2008 (Versuch 2). Alle Werte, die den Höchstgehalt für DON in Getreide überschreiten, sind fett hervorgehoben.

Probe	Mittelwert DON in µg/kg
Kontrolle, Topf 1 (UK 1)	107,0
Kontrolle, Topf 3 (UK 3)	47,6
Kontrolle, Topf 4 (UK 4)	0
Infizierte Pflanzen (Befall 0 - 5%)	3583,4
Infizierte Pflanzen (Befall 5-30%)	> 6300
Infizierte Pflanzen, Vorversuch (1b - 6b)	> 6300

Tabelle 6: Mittlere DON-Gehalte der Körner der untersuchten Probenklassen aus dem Zeitreihenversuch im September 2008 (Versuch 3).

Probe	Mittelwert DON in µg/kg
Befall 0%	662,5
Befall 2–5%	884,0
Befall 10–15%	1109,3
Befall 20–25%	1561,2
Befall 30–50%	1820,6
Befall > 60%	1924,4
Kontrolle, Topf 1 & 2 (UK 1 & 2)	9,1
Kontrolle, Topf 3 & 4 (UK 3 & 4)	66,8

4 Gesamtbetrachtung und Ausblick

4.1 Chlorophyllfluoreszenzanalyse

Applikation der Methode zur head-blight-Erkennung (Fragestellung 1)

Die Chlorophyllfluoreszenz-Bildanalyse ist ein gut etabliertes, effektives Werkzeug zur umfassenden Einschätzung der Entwicklung und der Effekte von bakteriellen, pilzlichen und viralen Infektionen an Blättern von vielen Kulturpflanzen (DALEY 1995, KUCKENBERG et al. 2009, NEDBAL und WHITMARSH 2004, ROLFE und SCHOLES 2010). Sie ermöglicht ein Arbeiten sowohl an intakten Pflanzen (BONFIG et al. 2006, BÜRLING et al. 2010) als auch an isoliertem Pflanzenmaterial in Form von ausgestanzten Blattscheiben (CHAEERLE et al. 2004, 2007b).

An Weizen wurde die CFA u. a. zur Determination von Trocken- und Temperaturstress (MARTINEZ et al. 2003, WANG et al. 2011), Nährstoffversorgung (TARTACHNYK et al. 2006) und verschiedener Krankheiten (Blattrost: BÜRLING et al. 2010, KUCKENBERG et al. 2007, Blatt- und Spelzenbräune: ROBERT et al. 2006) eingesetzt. Zur Analyse der Partiellen Taubährigkeit bei Weizenähren wurde die CFA bisher noch nicht genutzt. Besonders in der Anfangsphase der Infektion, bereits ab dem 6. Tag nach Inokulation, ist diese Methode der hyperspektralen Erkennung überlegen. Da mittels F_v/F_m ein Aktivitätsparameter gemessen wird, der die Intaktheit des photosynthetischen Apparates prüft, greift er, bevor visuell sichtbare Symptome erkennbar werden.

In dieser Arbeit wurde ebenfalls der Quotient F_v/F_0 für die Erkennung befallener Ähren geprüft, weil einige Arbeiten diesen Parameter als geeigneten Indikator von Krankheitsbefall vorschlugen (vgl. KUCKENBERG et al. 2007). F_v/F_0 wird als ein Wert angesehen, der den maximalen Quantenertrag (maximal quantum yield) der Fluoreszenz widerspiegelt (BUSCHMANN et al. 1999). Als Indikator des PS II-Zustandes wird er empirisch hergeleitet. Dieser Parameter wurde beispielsweise genutzt, um die Energietransportrate vom PS II zum PS I bei -196°C zu bestimmen (KITAJIMA und BUTLER, 1975). Dennoch konnte bis jetzt keine klare physiologische Bedeutung mit F_v/F_0 beschrieben werden (MATOUŠ et al. 2006).

Im Gegensatz dazu zeigt F_v/F_m die PS II-bezogene photochemische Effizienz bei dunkeladaptierten Pflanzen mit vollständig offenen PS II-Reaktionszentren an (VON WILLERT et al. 1995, MAXWELL und JOHNSON 2000), wie auch schon bereits früh von KITAJIMA und BUTLER (1975) gezeigt. Daraus ableitbar sind die aktuelle Nutzung der absorbierten Lichtenergie (Quantenausbeute), der Aktivitätszustand des PS II sowie seine Behinderung oder Schädigung durch verschiedene Umweltfaktoren (VON WILLERT et al. 1995). Aufgrund dieser direkten Herleitung wurde der Parameter F_v/F_m präferiert, um den Befallsgrad von intakten Ähren zu analysieren. Durch die langjährige Anwendung des Ansatzes musste dessen Sinnhaftigkeit nicht erst nachgewiesen werden, die Ergebnisse wurden stattdessen so aufbereitet, dass eine schnelle und effektive Erkennung *Fusarium*-befallener Ähren möglich wurde.

Der Grad der Erkrankung an Partieller Taubährigkeit wirkt sich unmittelbar auf das F_v/F_m -Verhältnis aus, da die *Fusarium*-pilze die besiedelten Ährchen der Wirtspflanze so stark schädigen, dass Stoffwechsel- und Photosyntheseprozesse zum Erliegen kommen. Möglicherweise spielen auch die von den Pilzen produzierten Mykotoxine dabei eine nicht unwesentliche Rolle. PINTO et al. (2000) vermuteten bei Pilzinfektionen mit *Colletotrichum musae* und *Fusarium moniliforme* an Mais und Banane, dass die

Reduktion der maximalen Photosyntheseleistung bei beiden Arten durch die von den Pilzen produzierten Toxine verursacht wurde (vgl. Kapitel 1.2).

Die Messung der photosynthetischen Effizienz (F_v/F_m) zeigt Veränderungen deutlicher an, als die Parameter F_v und F_m (vgl. Kap. 1.4.2.2, Abb. 4). Der Befallsgrad korreliert eng mit der photosynthetischen Effizienz und ist damit ein geeigneter Parameter zur Detektion von Partieller Taubährigkeit.

Integration der stark variierenden räumlichen Verteilung der photosynthetischen Effizienz im Auswertealgorithmus (Fragestellung 2)

Die konventionellen Fluoreszenzhandmessgeräte unterschiedlicher Firmen wie Heinz Walz GmbH, Hansatech Instruments Ltd., Photon Systems Instruments; Opti-Sciences Inc., EARS Holding B.V. messen nur den durchschnittlichen Chlorophyllfluoreszenzwert an einem bestimmten Punkt des untersuchten Objektes. In einer Studie zur Erkennung des „tulip breaking virus“ (TBV) an drei Tulpensorten mit unterschiedlichem Blattfarbenmuster benutzen POLDER et al. (2009) den durchschnittlichen F_v/F_m -Wert, um die TBV-Infektion so genau und zeitig wie möglich unter Laborbedingungen zu identifizieren. Die Ergebnisse des durchschnittlichen F_v/F_m differierten bis zu 46 % vom mittels ELISA-Test bewerteten Krankheitsgrad. Ein nicht abzuweisender Punkt ist möglicherweise, dass eine Durchschnittsbildung der Fluoreszenzparameter die meisten krankheitsrelevanten Unterschiede nivelliert (BONFIG et al. 2006).

Statt des durchschnittlichen Chlorophyllfluoreszenzwertes wurde in dieser Studie die räumliche Variabilität der Krankheitsentwicklung unter Nutzung der Chlorophyllfluoreszenzbilder analysiert. Dieser Ansatz erlaubt die Evaluierung der Veränderungen des für head blight-typischen Infektionsmusters. Während der Krankheitsentwicklung vergrößern sich die Bereiche mit toten Ährchen und demzufolge niedrigem F_v/F_m (<0,3), die sich mit gesunden Ährchen mit hohem F_v/F_m (>0,3) abwechseln. Deshalb wurde das räumliche Verteilungsmuster und nicht die durchschnittliche Chlorophyllfluoreszenz zur Bestimmung des Befallsgrades genutzt. Statt der Nivellierung der Unterschiede bei Durchschnittsbildungen aller F_v/F_m kristallisierten sich bei Betrachtung einer relativ kleinen Werteklasse deutliche Unterschiede zwischen gesunden und infizierten Pflanzen heraus. Durch Aufsummierung aller F_v/F_m -Werte bis zum Wert 0,3 wurde eine Erkennung der Partiellen Taubährigkeit möglich und sogar in 10%-Schritten differenzierbar. Diese mathematische Operation ist zudem leicht programmierbar und schnell, was in Hinblick auf eine angedachte Erkennung im Feld essentiell ist.

Ermittlung des Detektionszeitfensters (Fragestellung 3)

Basierend auf der Physiologie der Photosynthese erlaubt die Chlorophyllfluoreszenz-Bildanalyse eine Detektion der Anfangsphase der Gewebeschädigung.

Aus der Literatur (HÄUSER-HAHN 2005, KUCKENBERG et al. 2007) war bekannt, dass Variationen in der photosynthetischen Aktivität und, begleitend in der Chlorophyllfluoreszenz, sogar in einer frühen Phase der Infektion hervorgerufen werden. Deshalb wurde eine tägliche Aufnahme während der ersten Woche nach Inokulation

gewählt. Allerdings zeigten die Messungen, dass früheste Veränderungen auf zellulärer Ebene einen geringen Effekt auf das PS II hatten. Nur wenn die Intaktheit der Wirtspflanzenzellstrukturen durch die Pilze zerstört wurde, wurde das photosynthetische System geschädigt. Diese Interpretation stimmt mit den Erkenntnissen von KANG und BUCHENAUER (2000a) und BROWN et al. (2010) überein. Mithilfe der Licht- und Elektronenmikroskopie zeigten diese Autoren, dass durch die dominierenden Pilzhyphe zelluläre Veränderungen wie Degeneration des Zytoplasmas und der Zellorganellen, die Auflösung der Zellwände und die Ablagerung des Materials an den Gefäßwänden der kranken Ähren erst 4-5 Tage nach Infektion erscheinen.

Allerdings hängt die Leistungsfähigkeit der Chlorophyllfluoreszenzanalyse oder -bildauswertung zur Erkennung von Infektionen nicht nur, wie in der vorliegenden Arbeit klar gezeigt, von der Zeit nach der Inokulation ab. Die Effektivität der Erkennung kann bei anderen Infektionen auch stark vom untersuchten Objekt beeinflusst werden. Bei Untersuchungen von MATOUŠ et al. (2006) war *Pseudomonas syringae* bei *Arabidopsis thaliana* innerhalb weniger Stunden nach Infektion detektierbar. Im Gegensatz dazu fanden KUCKENBERG et al. (2009) zwei bis drei Tage, bevor Blattrost bzw. eine Mehltauinfektion auf Blättern von Winterweizen sichtbar wurde, verminderte F_v/F_0 -Werte. Pusteln des Blattrostes erschienen ab dem 7. dai, Mehltausymptome ca. ab dem 9. dai. Die F_v/F_0 -Werte sanken stark bei der Rostinfektion ab dem 6. dai um 0,4 (relative Einheit) und die F_v/F_m -Werte weniger deutlich um 0,02 (relative Einheit) gegenüber den Kontrollen. Erste Symptome einer Infektion mit *Venturia inaequalis* bei Apfelsämlingen sind 7 Tage nach Infektion erkennbar (FÖRSCHLER et al. 2003). Hingegen ist die Identifikation von Nadelrost (*Chrysomyxa rhododendri*) erst 3 Wochen nach Infektion möglich. Früher konnten BAUER et al. (2000) die Auswirkungen dieser Pilzinfektion bei Sämlingen der Gemeinen Fichte (*Picea abies*) durch Chlorophyllfluoreszenzanalyse nicht nachweisen.

Wie mit in Kapitel 3.5 vorgelegten Ergebnissen zusätzlich gezeigt wurde, setzt die CFA bei der Erkennung von *Fusarium*-Infektionen bei Weizen leider auch Grenzen, wenn es um das Ende der festzulegenden Detektionsspanne geht, also dem spätestmöglichen Zeitpunkt der Erkennung. Bei einsetzender Reife verringert sich F_v/F_m durch den Abbau des Chlorophylls und ist deshalb nicht mehr als Parameter zur eindeutigen Krankheitserkennung geeignet (vgl. Abb. 13). Der zur Erkennung von Partieller Taubährgkeit genutzte Wert des kumulativen F_v/F_m bei 0,3 steigt mit zunehmender Reife. So konnten mit einem vorzeitigen Anstieg des kumulativen F_v/F_m bei 0,3 diejenigen Kontrollpflanzen identifiziert werden, die aus einer früher ausgesäten Charge stammten. Die meisten gesunden Kontrollpflanzen zeigten erst am 23. dai einen Anstieg des kumulativen F_v/F_m durch Reife. Das heißt, prinzipiell ist auch die CFA über einen längeren Zeitraum – bis dai 23 – zur Krankheitsunterscheidung einsetzbar. In dem beschriebenen Experiment konnte sich die Detektion mittels CFA allerdings nur bis zum dai 11 beschränken, weil drei Kontrollpflanzen vorzeitige Reifesymptome zeigten.

Einige Autoren favorisieren die Thermographie zur frühestmöglichen Erkennung von Erkrankungen. In Untersuchungen zu Pepper-Mild-Mottle-Virus-Infektionen an Tabak (CHAERLE et al. 2006) traten dabei unmittelbar nach Infektion - sieben Tage bevor sich Chlorophyllfluoreszenzmuster änderten - Temperaturerhöhungen der asymptomatischen Blätter auf. Wie aber bereits in Kap. 1.3.2.1 erläutert, reagiert die Thermographie sehr sensitiv auf variable Umgebungs- und Pflanzenparameter (HELLEBRAND et al. 2006), was ihre Nutzung wiederum für die Erkennung von Partieller Taubährgkeit eingeschränkt hätte.

Detektionsgenauigkeit von CFA bei unterschiedlichen Befallsgraden (Fragestellung 4)

F_v/F_m erwies sich als hilfreicher Indikator für die Schädigung der photosynthetischen Aktivität durch *Fusarium culmorum*. Mit der kumulativen Berechnung von F_v/F_m bei 0,3 wird eine sehr hohe Detektionsgenauigkeit erreicht (10% RMSE). Die F_v/F_m -Anteile in den niedrigen Effizienzklassen steigen allmählich von <1% (2-3% Befall) auf 10 % bei 10-20% Befall, nehmen ein gutes Drittel bei 40-60% Befall ein und stellen 85% aller F_v/F_m -Werte bei 90% Befall. Eine Durchschnittsbildung aller Werte des gemessenen Objektes hätte diese Unterschiede nivelliert. Mit der expliziten Betrachtung bestimmter Werteklassen von F_v/F_m gelingt es aber, die Auswirkungen der *Fusarium*-Schädigung auf das PS II genau zu erfassen. Bei einem Befallsgrad von mindestens 5% können die Befallswerte in 10%-Schritten klar unterschieden werden. Diese Ergebnisse heben sich auch deutlich von den nur ansonsten gering veränderten F_v/F_m bei verschiedenen Erkrankungen ab (KUCKENBERG et al. 2009, POLDER et al. 2009), die alle Effizienzklassen einbezogen und damit geringere Änderungen durch eine Durchschnittsbildung erhielten.

Angestrebt wird eine Ableitung des Befallsgrades aus den F_v/F_m -Werten für die Praxis. Mit einem $R^2=0,98$ und einem Fehler von 5,78% (Befall) kann nach der Formel $y=4,00+1,073x$ aus den kumulativen F_v/F_m -Werten bei 0,3 der Befallsgrad abgeleitet werden. Damit könnte frühzeitig ein Befall erkannt und die Feldpartien „markiert“ werden.

Testung der Methode unter Feldbedingungen (Fragestellung 5)

Die derzeitige Technik der Chlorophyllfluoreszenzbildanalyse zur Identifizierung von head blight im Feld erfordert sicherlich noch Verbesserung. Durch ihre komplexe physiologische Natur hängen Fluoreszenzsignale direkt von der jeweiligen photosynthetischen Photonenflussdichte ab (MAXWELL und JOHNSON 2000). Daher muss veränderliches Licht und direkte Belichtung mit Sonnenlicht während der Messung vermieden werden. Außerdem müssen die Pflanzen vor der Messung von F_0 und F_m dunkeladaptiert werden (BRAVO et al. 2004, PETKOVA et al. 2007, VON WILLERT et al. 1995). Wie in der vorliegenden Studie gezeigt, sind diese Erfordernisse einhaltbar.

Obwohl das genutzte Messsystem zum Laborgebrauch entwickelt wurde, konnte eine hohe Korrelation ($R^2 = 0,66$) zwischen Fluoreszenzanalyse und Befallsbonitur unter Feldbedingungen erhalten werden. Die Abweichungen haben zwei mögliche Ursachen. Erstens ist die Messmethode der CFA im Freiland (noch) nicht optimiert. Zweitens kann sie durch die Subjektivität der Befallsbonitur verursacht sein. Die verwendete Skala für die visuelle Bonitur hat eine Schrittweite von 10 %; deshalb würde der absolute Boniturfehler im schlimmsten Fall 10 % betragen.

Methodische Probleme bei den Messungen mit der FluorCam können nicht ganz ausgeschlossen, aber durch entsprechende Handhabung des Systems minimiert werden. Besonders schwierig sind CFA-Aufnahmen bei starkem Wind. Durch die Bewegung der Ähren während der Aufnahmesequenzen für F_0 und F_m entstehen nicht vollständig deckungsgleiche Bilder dieser beiden Parameter. Durch Verkürzung der Gesamtaufnahmezeit auf 2 s kann das Problem verringert werden. Trotzdem können die peripheren Bereiche der Ähren, welche durch Wind beeinflusst sind, inkorrekt niedrige

F_v/F_m -Werte aufweisen. Während der Datenanalyse können daraus resultierende schlecht erkennbare Randgebiete der ROIs von weiteren Berechnungen ausgeschlossen sein. Auch eine nicht vollständige, ungleichmäßige Beschattung in der Messbox bringt gelegentlich eine Überschätzung der Grundfluoreszenz und folglich einem fehlerhaft geringen F_v .

Ein Ausschluss aller identifizierten Ausreißer reduzierte die Zahl der analysierbaren Ähren um ein Drittel, allerdings stieg dadurch das Bestimmtheitsmaß der Korrelation zwischen Fluoreszenzanalyse und visueller Krankheitsinspektion auf $R^2 = 0,80$. Der Anstieg des Bestimmtheitsmaßes um 14 Prozentpunkte durch Optimierung der Messmethode bzw. durch Ausreißereliminierung belegt, dass zumindest dieser Anteil des Gesamtfehlers direkt auf die Messmethode zurückzuführen ist und dabei der mögliche Fehleranteil der Bonitur konstant ist. Dies zeigt klar das hohe Potential der Chlorophyllfluoreszenzbildanalyse für eine nicht-invasive Krankheitserkennung nach weiterer Verbesserung der Messtechnik und des Protokolls.

4.2 Hyperspektrale Bildanalyse

Anwendung eines vorhandenen Klassifizierungsalgorithmus` (Detektionsgenauigkeiten und Zeitfenster) (Fragestellung 11)

In der Bildanalyse ist je nach Datenlage eine überwachte und unüberwachte Klassifikation möglich. Bei der unüberwachten Klassifikation erfolgt die Zuordnung zu den verschiedenen Spektralklassen auf automatisiertem Wege. Unter Vorgabe bestimmter Parameter (z. B. Anzahl der Klassen) wird dem Rechner überlassen, diese Zuordnung durchzuführen. Letztendlich ist es eine Wertegruppierung basierend auf ähnlichen statistischen Eigenschaften, wobei ähnliche Pixelwerte zu einem Wert zusammengefasst werden können (Algorithmen: IsoData, k-means). Die einzelnen Bildpunkte (Pixel) besitzen bestimmte Grauwerte und entsprechen den Farben im Bild.

Sind die zu trennenden Klassen bekannt, können überwachte Klassifikationsmethoden, wie Minimum Distance, Parallelepiped, Maximum Likelihood, Mahalanobis Distance, Binary Encoding und Spectral Angle Mapper eingesetzt werden.

Die verschiedenen überwachten Klassifikationsalgorithmen, die für eine automatische Identifikation zur Verfügung stehen, besitzen ihre spezifischen Vorteile. Im Fall der multispektralen Bildanalyse mit nur wenigen Kanälen werden gute Ergebnisse mit der Klassifikationsmethode „Maximum Likelihood“ erreicht (CASTILLEJO-GONZÁLEZ et al. 2009, YANG und EVERITT 2010). Im Gegensatz dazu erzielte der „Spectral Angle Mapper“ gute Klassifikationen mit hyperspektralen Bildern (SOUTH et al. 2004, BECKER et al. 2007).

In einem Ansatz zur automatischen Identifizierung von *Fusarium*-infizierten Weizenähren mithilfe von RGB-Bildanalyse wendeten HEHMKE et al. (2007) zwei Methoden der überwachten Klassifizierung an, die Maximum Likelihood (RICHARDS und JIA 1999, ENVI 2005) und die SAM-Methode. In Auswertung der RGB-Bilder, die sowohl unter Licht- als auch Schattenbedingungen aufgenommen wurden, lieferte Maximum Likelihood immer eine bessere Klassifikation als SAM. Wie auch immer, verglichen zu RGB-Aufnahmen enthalten Hyperspektralbilder viel mehr Informationen, weil sie auf einer enormen Anzahl von spektralen Bändern basieren. SAM erlaubt eine schnelle Abbildung spektraler Ähnlichkeiten (YUHAS et al. 1992, KRUSE et al. 1993) und liefert meist gute Klassifizierungsergebnisse (SOUTH et al. 2004). Die Methode vergleicht direkt die Ähnlichkeit verschiedener Vektoren („spectral angles“) von unterschiedlichen, bestimmten

Klassen und resultiert dann in effizienteren und genaueren Klassifizierungsergebnissen der Hyperspektralbilder verglichen beispielsweise mit Maximum Likelihood. Darüber hinaus ist die Bildauswertung mit SAM unabhängig von variierenden Objektbeleuchtungen. Daher scheint der SAM für die Klassifikation unter semipraktischen Bedingungen, die hier angewendet wurden, geeignet. Tatsächlich erzielte der SAM sehr gute Klassifikationsergebnisse in dieser Studie. Der Befallsgrad wurde, unter Berücksichtigung eines Boniturfehlers von 10%, zu 87% richtig klassifiziert.

Dennoch benötigt die Aufnahme und Analyse der 512 Wellenlängenbänder erheblichen Rechenaufwand. Anders als bei Laborstudien ist dies für eine online-Anwendung unter praktischen Feldbedingungen wenig praktikabel. Auf einem Traktor installierte Kamerasysteme müssen die spektralen Informationen innerhalb von Sekunden sowohl aufnehmen als auch analysieren. Des Weiteren ist der Vergleich mit krankheitsspezifischen Spektren bzw. das Setzen von „regions of interest“ zeitaufwändig und schwer in praktische Prozesse zu integrieren.

Ein weiteres wichtiges Problem bei der Krankheitsklassifizierung durch spektrale Bildanalyse ist die Wahl des korrekten Entwicklungsstadiums, ansonsten können die Ergebnisse ungenau werden. Wenn die Messungen zu früh beginnen, werden Blütenreste (Antheren) und sterile Ähren (hervorgerufen durch Wachstumsstörungen) als krank klassifiziert. Damit basierte in der Anfangsphase der vorliegenden Studie der geringe Infektionsgrad (ca. 3%) an gesunden Ähren (Kap. 3.2, Abb. 6) klassifiziert mit SAM nicht auf head blight, sondern spiegelte Entwicklungsstörungen wie taube Mittelährchen oder Spitzen wider. Dies bedeutet, dass andere als durch *Fusarium* verursachte Schädigungen zwangsläufig als krank klassifiziert werden.

Die Klassifizierungsergebnisse könnten in einigen Fällen sowohl durch Auswahl verschiedener spezifischer Winkelradianten bei den entsprechenden Objektklassen als auch durch manuelles Anpassen des Winkelradianten durch Setzung eines niedrigeren Wertes, z. B. 0,05 verbessert werden. Dennoch sind solche Variationen durch die spezifische Anpassung zeitaufwändiger.

Mit beginnender Reife wird das Spektrum von gesunden und kranken Ähren ähnlicher, was zu einem Anstieg von Missklassifikationen führt (Kap. 2.6, Abb. 13). Unklassifizierte Pixel reflektieren die fortschreitende Degradation des Chlorophylls während der Reife, was ohne die krankheitstypische spektrale Signatur der infizierten Körner auch in gesunden Ähren auftritt. In der verwendeten Klassifikation wurde solch eine Klasse nicht spezifiziert, wird aber in einem weiteren Optimierungsschritt angestrebt. Dies muss besonders bei Kontrollpflanzen überprüft werden, welche frei von *Fusarium*-Infektionen sind.

Im gewählten SAM-Klassifizierungsmodus wurden Möglichkeiten geprüft, den erheblichen Zeit- und Rechenaufwand bei Berücksichtigung der gesamten spektralen Breite mit 512 Wellenlängenbändern zu verringern. Ein Ansatz zur Erhöhung der Klassifikationseffizienz ist, die Anzahl der spektralen Informationen zu verringern. Die Effekte der Reduzierung der spektralen Bereiche auf 168 ausgewählte, krankheitsrelevante Bänder für die SAM-Klassifikation konnten in ENVI leicht simuliert werden. Auf Grundlage spektraler Teilbilder (subsets) der hyperspektralen Aufnahmen konnten die Effektivität und Detektionsgenauigkeit bei diesem Vorgehen eingeschätzt werden. Sicherlich führt eine verminderte Banddichte zu viel kürzerer Rechenzeit; aber die schnelleren Ergebnisse sind ungenauer in der Klassifikation. Die Verringerung der Anzahl der Bänder führt in vielen Fällen zu einer Überbewertung des Krankheitsgrades. Dieser Effekt ist am deutlichsten während des BBCH 75. Dennoch, selbst wenn die Zahl der Bänder reduziert

wurde, erfordert diese Analyse die Aufnahme des Eingangsspektrums. Zusätzlich bleibt die zeitaufwändige Notwendigkeit des Setzens von ROIs. Deshalb ist diese Methode mit einer Missklassifikationsrate bis zu 37% nur wenig geeignet für praktische Anwendungen.

Bestimmung der distinkten Wellenlängenbereiche für eine erfolgreiche Diskriminierung von Partieller Taubährigkeit (Fragestellung 6) und Ausarbeitung einer einfach anwendbaren Klassifikationsmethode unter semi-praktischen Bedingungen (Fragestellung 8)

Die spektralen Muster der gesunden und kranken Ähren waren signifikant unterschiedlich im untersuchten spektralen Bereich von 400-1000 nm. Die spektralen Veränderungen während der Krankheitsentwicklung basieren auf den Veränderungen des Carotinoidgehaltes (500-533 nm) und besonders des Chlorophylls (560-675 nm und 682-733 nm). Darüber hinaus spiegeln Veränderungen im Bereich von 927-931 nm Unterschiede im Wassergehalt bei gesunden und kranken Pflanzengeweben wider. Obwohl bei allen genannten Wellenlängenbereichen eindeutig pflanzenphysiologische Ursachen reflektiert werden, war die Anwendung von mathematischen und statistischen Methoden wie Interpolation, Glättung, Standardisierung, Differenzbildung notwendig, um eine solide Grundlage für die statistische Berechnung und umfassende Bildanalyse bereitzustellen.

Sowohl für die Bild- als auch Spektralanalyse sind verschiedene Indices gebräuchlich. Der weitverbreitetste Index zur Charakterisierung grüner Vegetation ist der sogenannte "Normalized difference vegetation index (NDVI)". Der NDVI ist hauptsächlich zum Erkennen gesunder, chlorophyll-haltiger Pflanzen hilfreich. Daher bringt die Anwendung dieses Index keine sinnvollen Ergebnisse in dieser Studie mit Zielstellung „Fusariumerkennung“. Das Gleiche galt für andere oft benutzte Indices, wie dem „greenness-band“ ($G = R_{554} / R_{677}$, ZARCO-TEJADA et al. 2005), dem „structure intensive pigment index“ (SIPI, PEÑUELAS et al. 1995), dem „normalized pigment chlorophyll index“ (NPCI, PEÑUELAS et al. 1994) oder den Lichtenthaler-Indices (Lic1 and Lic2, LICHTENTHALER et al. 1996a,b). Sie waren alle weniger geeignet, um gesunde und *Fusarium*-infizierte Weizenähren zu trennen. Zum Beispiel können, im Fall des greenness-Bandes oder des NPCI, kranke Gewebereiche nicht explizit angezeigt werden, aber gerade die chlorophyllfreien Ährchen müssen bei *Fusarium*-Infektionen determiniert werden. Darüber hinaus war beim SIPI ein Schwellenwert zur erfolgreichen Erkennung infizierter Gewebe schwer zu definieren.

Bei *Fusarium*-infiziertem Ährengewebe sank die Absorption im Bereich der Chlorophyllbänder schnell mit Entwicklung der Infektion als ein Ergebnis der Zerstörung der Chloroplasten und des sukzessiven Abbaus des Chlorophylls in den pilzbefallenen Zellen (KANG und BUCHENAUER 2000a). Die Abnahme des Chlorophyllgehaltes in diesen Zellen reduzierte die Möglichkeit des internen Photonen-Re-Emissions- und Re-Absorptionsprozesses in diesen Wellenlängenbereichen. Dies führt zu einer ausgeprägten Verlagerung (bis zu 15 nm) des 'red-edge' Wendepunktes des Spektrums (BARET et al. 1988) bei ungefähr 700 nm hin zu kürzeren Wellenlängen.

In dieser Untersuchung wurden all die oben beschriebenen Veränderungen mit zunehmenden Infektionsgrad deutlicher. Ähnlich berichteten MUHAMMED und LARSOLLE (2003) von einer zunehmenden Abflachung des grünen Reflexionspeaks und starker Abnahme der Reflexion in den Nahinfrarot-Wellenlängen mit Zunahme des Krankheitsgrades (0,6%; 5,2%, 49,2%; 76,1%) bei *Drechslera tritici-repentis*-Infektionen

bei Sommerweizenblättern. Darüber hinaus fanden diese Autoren mit zunehmendem Befallsgrad der untersuchten Blätter auch eine vergleichbare Abnahme im Nahinfrarot-Reflexionsplateau begleitet mit einer verstärkten Reflexion in der sichtbaren Region (550-750 nm).

Im Gegensatz dazu analysiert der vorgeschlagene head blight index (HBI) nur zwei spektrale Bereiche von 10 nm Breite (665–675 nm und 550–560 nm). Diese zwei Bereiche reflektieren Veränderungen bei den bedeutenden photosynthetischen Pigmenten (Chlorophyll und Carotenoide) und kennzeichnen effektiv infektionsinduzierte physiologische Schäden. Im Ergebnis zeigen beide Bereiche mit Abstand die bedeutendsten Veränderungen in der spektralen Signatur. Bei Anwendung des HBI kann die Datenerhebung technisch weniger aufwändig und ihre Auswertung viel schneller sein. Deshalb könnte der HBI ein Index für eine zeitige Detektion einer *Fusarium*-Infektion sein, obwohl er etwas weniger effizient ist als SAM. Etwa 84% der gesunden und infizierten Gewebe fielen in den Bereich mit einer Fehlerabweichung $\pm 10\%$. Dieses Fehlerintervall scheint akzeptabel zu sein, weil ja der Boniturfehler in der gleichen Größenordnung liegt (WALTHER et al. 2000). Die visuelle Bonitur ist immer subjektiv und die Fehlerquote könnte daher stark von den persönlichen Fähigkeiten der bewertenden Person abhängen. Andererseits wird der tatsächliche Befall im Feld dreidimensional bonitiert, weil die Ähre als Ganzes betrachtet wird (WALTHER et al. 2000). In der Bildanalyse erscheint das Objekt hingegen nur zweidimensional. Durch Verlust der einen Dimension kann die Genauigkeit der Bildanalyse leiden.

Ungeachtet dieser Probleme kann dieser vorliegende Ansatz schnell wertvolle Informationen zum Befallsgrad der *Fusarium*-Infektion bei Weizen liefern und deshalb das Risiko seiner Mykotoxinkontamination anzeigen. Andererseits wird bezweifelt, ob die visuellen Symptome der Partiellen Taubährigkeit immer den detektierbaren Mykotoxingehalt widerspiegeln (MIEDANER und SCHNEIDER 2002). Auch in der vorliegenden Studie traten starke Schwankungen der Mykotoxingehalte auf. Dennoch waren bei Befallsgraden über 20% immer die EU-weit verbindlichen Grenzwerte von 1250 $\mu\text{g/kg}$ für das Leittoxin DON überschritten. In einem Versuch betrugen die Mykotoxingehalte bei einem Befallsgrad von bis zu 5% das Drei-, bei einem Befallsgrad $>30\%$ bis zu mehr als das Sechsfache des vorgeschriebenen Grenzwertes. Daher wurde deutlich die akzeptierte Konzentration, die vermutlich noch nicht die Gesundheit gefährdet, überschritten. Die Analysen zeigen auch, dass eine genaue Detektion gerade der unteren Befallsklassen enorm wichtig ist.

Bestimmung des optimalen Ährenentwicklungsstadiums für eine Krankheitsdetektion/Bestimmung des Detektionszeitfensters (Fragestellung 7)

Wie die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse deutlich zeigen (BAURIEGEL et al. 2011a, b, Kap. 3.6), ist für eine genaue Klassifikation des Befallsgrades der *Fusarium*-Infektion bei Weizen das Zeitfenster zur Bestimmung sehr wichtig. Mit der hyperspektralen Bildauswertung sind infizierte Ähren 7 Tage nach Inokulation von den Kontrollen unterscheidbar.

Diese hier gefundene Zeitspanne wurde später unter Freilandbedingungen bestätigt. Messungen mit einer Multispektralkamera in Weizenbeständen mit Sorten unterschiedlicher Reifezeitpunkte und Anfälligkeit gegenüber *Fusarium* brachten zu einem fortgeschrittenen Entwicklungszeitpunkt der Ähre (BBCH=EC 85) keine befriedigenden Ergebnisse (DAMMER et al. 2011). Dagegen war im Stadium EC 75-83 die

Detektion auch mit dieser Methode durchaus erfolgreich. Ähnliches wird durch Untersuchungen bei *Fusarium*-Infektionen an Hartweizenpflanzen berichtet (LAGUETTE et al. 2004). Unter Verwendung roter (R), nahinfraroter (NIR) und mittelinfraroter (MIR) spektraler Bänder fanden diese Autoren eine Woche nach Blüte (BBCH 73) erste wesentliche Unterschiede zwischen der spektralen Signatur gesunder und infizierter Pflanzen.

Auswirkung stetiger und unstetiger Merkmale auf die automatisierte Krankheitserkennung (Fragestellung 10)

Der Abbau des Chlorophylls ist ein stetes Merkmal der durch *Fusarium* verursachten Partiellen Taubährigkeit. Der rote Sporenbelag wird nicht konstant ausgebildet und kann dementsprechend kein alleiniges bildanalytisches Erkennungsmerkmal darstellen. Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit (Kap. 3.2) zeigten, dass dieses zusätzliche Merkmal bei der spektralen Auswertung (PCA) ebenfalls als krank eingeordnet wird und damit die Erkennbarkeit der Fusariosen nicht verringert.

Andere pilzliche Erreger wie *Pseudocercospora herpotrichoides*, Verursacher der Halmbruchkrankheit, und *Ophiobolus graminis*, Verursacher der Schwarzbeinigkeit, können ebenfalls eine Weißährigkeit hervorrufen. Allerdings verursachen diese pilzlichen Erreger einen ganzjährigen und nicht wie bei *Fusarium* einen partiellen Chlorophylldefekt. Die bildanalytische Erkennung mittels CFA und HSA mit den genutzten Spektralbereichen kann eine automatische Detektion der Symptome ermöglichen. Sie kann aber nicht den Nachweis der entsprechenden, gebildeten Mykotoxine ersetzen.

Effekt des Befallsgrades auf die Detektionsgenauigkeit der HSA (Fragestellung 12)

Wie bei der Chlorophyllfluoreszenzmethode muss ein Befallsgrad an Partieller Taubährigkeit von mindestens 5% ausgebildet sein (BAURIEGEL et al. 2010, Kap. 2.1). In der vorliegenden Studie traten bei den Kontrollpflanzen beispielsweise Entwicklungs- und Wachstumsstörungen in dieser minimalen Ausprägung auf, die zu einer Fehlklassifikation führten.

Bei den hyperspektralen Erkennungsmöglichkeiten ist die Genauigkeit weniger vom Befallsgrad, sondern viel stärker vom Zeitpunkt der Aufnahmen abhängig. Dies trifft sowohl für die SAM-Klassifikation mit 512 und 168 Bändern zu als auch für die Detektion mit dem HBI.

Bei der SAM-Klassifikation mit nur 168 Bändern ist die Missklassifikation von bis zu 37% zu hoch in Relation zum Aufwand. Bei Verwendung aller 512 Bänder ist der Zeitraum BBCH 65 bis 75/77 optimal mit einer Befallsabweichung von ca. 4%.

Die Trefferquote mit dem entwickelten HBI liegt im gesamten Zeitraum (BBCH 65 bis 89) bei 67%. Unter Berücksichtigung des optimalen Klassifizierungszeitpunktes kann die Genauigkeit der Detektion mit diesem Index noch deutlich erhöht werden (Kap. 3.6, Abb. 15). So ist beim Einsatz des HBI-Index die mittlere absolute Abweichung der Residuen im Reifestadium BBCH 85 bis 89 mit fast 21% Befallsabweichung unverträglich hoch, erreicht

aber mit etwas über 2% Befallsabweichung im BBCH 65 bis 75/77 sehr genaue Detektionsergebnisse.

4.3 Ausblick

4.3.1 Vergleich zwischen Chlorophyllfluoreszenz- und Hyperspektralanalyse

Die Vor- und Nachteile der CFA und HSA sollten bei der Krankheitserkennung von *Fusarium*-Infektionen herausgearbeitet und damit die Voraussetzungen geschaffen werden, diese Methoden unter Feldbedingungen einsetzen zu können.

Grundlegende verbesserte Bildauswertungstechniken mit reproduzierbaren und verlässlichen Datenaufnahmen stellen einen notwendigen ersten Schritt zum Optimieren der Krankheitserkennung dar. Erst dies kann die erforderliche Automatisierung bei der Krankheitserkennung ermöglichen.

Ohne Zweifel besitzen hyperspektrale Aufnahmen eine viel höhere Informationsdichte als Multispektral- und RGB-Bilder. Auch kann durch Einbeziehung vieler hundert Wellenlängen meist eine hohe Trefferquote bei der Schadedetektion erzielt werden bzw. die Erfassung von Reife, Qualität, und Krankheitsdefekten wird überhaupt erst möglich (GITELSON et al. 2003, LICHTENTHALER 1994, NICOTRA et al. 2003, POLDER et al. 2002, WILLIAMS et al. 2010). Allerdings sind momentan bei der Hyperspektraltechnik Aufnahme, Verarbeitung und Auswertung der Bilder deutlich zu langsam. Im Feld, bei einer Überfahrtgeschwindigkeit von ca. 10 km/h, können damit nicht zuverlässig Krankheitssymptome erkannt werden.

Nichtsdestotrotz erwies sich in der vorliegenden Arbeit das hyperspektrale System als wertvolle Möglichkeit, um aus den gewonnenen Daten die für eine sichere Erkennung von Ährenfusariosen relevanten Wellenlängenbereiche zu gewinnen. Diese Erkenntnisse können nun genutzt werden, um ein (nahezu) praxistaugliches, schnelles multispektrales Bildanalysesystem zu entwickeln.

Durch Einbeziehung der so ermittelten relevanten Wellenlängen und ihrer Verrechnung mittels des HBI-Indexes konnten *Fusarium*-infizierte Ähren unter Laborbedingungen erfolgreich klassifiziert werden. Allerdings sind noch weitere Untersuchungen notwendig, um diese Ergebnisse auf Feldbedingungen zu übertragen. Zu diesem Zweck müsste ein Kamerasystem, welches nur die relevanten spektralen Unterschiede in den Bereichen 550-560 nm und 665-675 nm analysiert, gebaut und erprobt werden. In einem weiteren Schritt könnte ein konstanter Kamerawinkel und Abstand zwischen Kamera und Bestand die nachfolgende Aufarbeitung der so erzielten Bilddaten vereinfachen. Inwieweit auch Größe und Anteil der erkrankten Ährchen pro Ähre in die multispektralen Auswertungen einfließen können, muss analysiert werden. Oft ist eine Vielzahl kleinerer fehllklassifizierter Pixel in den binären Auswertebildern anzutreffen. Der untere Schwellenwert für die Hyperspektralanalyse müsste an einem eindeutig detektierbaren Befallsgrad von mindestens 5% ausgerichtet werden.

Die vorgestellte Studie war gezielt auf eine sehr frühzeitige Detektion der *Fusarium*-Infektion im Winterweizenbestand ausgerichtet. Wie die hierbei erarbeiteten Ergebnisse klar zeigen, wäre es notwendig, die spektralen Messungen in den NIR-Bereich auszuweiten (WILLIAMS et al. 2010), wenn die Notwendigkeit besteht, gesunde und kranke Körner an vollreifen Ähren oder gar während der Ernte, also später als zum BBCH

85, zu klassifizieren. Die Spektralanalysen im NIR-Bereich ermöglichen auch die Abschätzung der Wassergehaltsabnahme während der fortschreitenden Infektion. Daher könnten generell wertvolle Informationen zur korrekten Bestimmung des Befallsgrades hinzugewonnen werden und damit eine verbesserte zeitige Detektion der *Fusarium*-Infektion ermöglicht werden.

Einige technische Lösungsansätze für die praktische Umsetzung der Anforderungen an Erntemaschinen zur getrennten Beerntung von Weizenpartien gibt es bereits. Ein Lösungsansatz ist die Trennung der Erntepartien zum Zeitpunkt der Ernte direkt im Kornstrom. Bei dieser qualitätsdifferenzierten Getreideernte wird der Mähdrescher mit einem NIR-(Nah-Infrarot) Sensor ausgestattet, der z.B. den Proteingehalt im Kornstrom bestimmt und damit letztendlich reguliert, in welchen Auffangbehälter das Erntegut gelangt (RISIUS et al. 2008). Diese Technik bei *Fusarium*-belastetem Getreide einzusetzen, ist zur Zeit noch nicht möglich (RISIUS et al. 2009). Um sicher zu gehen, müssten statt des Wassergehaltsparameters die Mykotoxine direkt bestimmt werden. Derzeit gibt es, wie in Kapitel 1 dargestellt, noch keine on- bzw. inline-Messgeräte.

Deshalb ist der in dieser Arbeit gewählte Ansatz der bildanalytischen Erkennung der Partiellen Taubährigkeit im Vorfeld der Ernte eine Alternative, um den stark zunehmenden Fusariumbefall in den Getreidekulturen räumlich auf dem Feld mittels Bildanalyse und GPS-Daten abzustecken. Mit dieser Befallskarte kann dann zum Zeitpunkt der Ernte der Mähdrescher befallene Flächen umfahren und stehen lassen. Auch anders konzeptionierte kleinräumig getrennt beerntende Mähdrescher könnten mit dieser Karte hoch- und minderwertigen Weizen differenziert ernten.

4.3.2 Auswertungsansätze zu Chlorophyllfluoreszenz- und spektralen Messungen

In einigen anderen Studien zu Bildanalyseansätzen der Chlorophyllfluoreszenz- und thermographischer Messung wurde zur Verknüpfung unterschiedlich auflösender Systeme und damit erzeugter Ergebnisbilder ein „resampling“ bzw. eine Interpolation vorgenommen. Dieser Ansatz erlaubt es, Informationen unterschiedlicher Messungen kombiniert auszuwerten. So wurde diese Methode genutzt, um Bildinformationen aus der Chlorophyllfluoreszenzanalyse und von thermographischer Messung zur quantitativen Analyse räumlich variabler physiologischer Prozesse an Blattoberflächen zu koppeln (ALDEA et al. 2006). Zur Darstellung des Erkrankungsgrades mit *Pseudoperonospora cubensis* (Falscher Mehltau) an Gurken nutzten OERKE et al. (2006) die maximale Temperaturabweichung. Der Falsche Mehltau zeigte ein ebensolches räumliches Verteilungsmuster wie es auch in dieser hier vorliegenden Arbeit analysiert wurde. Der Auswertealgorithmus erwies sich als ein sensibler Parameter zur Erkennung an sich als auch im Krankheitsentwicklungsverlauf.

Zur automatischen Erkennung von Gelbrost bei Weizen verrechnete BRAVO (2006) zwei Fluoreszenzbilder; aus ursprünglich vier aufgenommenen Wellenlängen waren die bei 550 und 690 nm aufgenommenen am erfolversprechendsten. Aus der relativen

Signalintensität dieser zwei Wellenlängen ($f_G = \frac{I_{550nm}}{I_{550nm} + I_{690nm}}$) bildete er einen Krankheitsindex (f_G) und definierte Pixel außerhalb des f_G -Wertes von 0,65 als „krank“.

Für jedes Blatt der mit Tulip Breaking Virus (TBV)-infizierten Pflanzen kalkulierten POLDER et al. (2009) den Mittelwert und die Standardabweichung in den photochemischen Effizienzklassen (0-1) der Fluoreszenzbilder. Da sich vorhandene Unterschiede durch eine Mittelwertbildung nivellieren können, blieb diese Vorgehensweise mit Fehlerquoten von 31-46% unter den Erwartungen und unter den Genauigkeiten, wie sie in dieser vorliegenden Arbeit zur *Fusarium*-Detektion oder bei Gelbrosterkennung bei BRAVO (2006) gefunden wurden. Auch BONFIG et al. (2006) bekamen durch gemittelte Bildpunkte der Infektions- und Umgebungszone nicht die erwarteten quantitativen Unterschiede im nichtphotochemischen Quenching heraus. Neben einer ausreichend genauen Auflösung sind die pixelweise Auswertung und die Herausstellung der Verteilungsunterschiede zielführender. Die Klassifizierung infizierter oder gesunder Ähren durch den kumulativen F_v/F_m bei 0,3, wie in dieser Studie eingeführt (Kap. 3.1), ist im Vergleich zu den anderen Ansätzen eine schnelle und genaue Analysemethode, weil sie die unterschiedlichen Pixelverteilungen sowohl räumlich als auch im Krankheitsverlauf herausstellt (BAURIEGEL et al. 2010, 2011b).

Bei sehr hochauflösenden Systemen, wie sie unter Laborbedingungen möglich sind, können bestimmte Formparameter integriert werden. Typisch bei der Partiellen Taubährigkeit ist das Nebeneinander verschieden großer Ährenanteile, die chlorophyllhaltig oder chlorophyllfrei sind. Ähnlich den Arbeiten von NICOTRA et al. (2003), die aufgrund eines räumlichen Musters des Chlorophyll a- zu b-Anteiles in einem Blatttransekt Entscheidungen zur Frostschädigung von Eukalyptusblättern treffen, wäre auch das eine zusätzliche interessante Erweiterung zur *Fusarium*-Erkennung.

Die nach spektralen Eigenschaften klassifizierten Pixel können desweiteren noch nach Größen- oder Formparametern eine verbesserte Zuordnung von kranken und gesunden Bereichen ermöglichen. POLDER et al. (2010) versuchten mittels Formparameter wie Größe (Länge, Breite, Tiefe des Objektes), Zahl der Pixel und mittlere Objektintensitäten die schwierige bildanalytische Krankheitserkennung bei unterschiedlich gefärbten Blättern zu verbessern. DAMMER et al. (2011) setzen durch manuelle Kalibrierung einen Schwellwert, mit dem falsch klassifizierte Pixel bzw. -cluster geringer Größe eliminiert wurden.

4.3.3 Verbesserung der Krankheitserkennung mit verknüpften Sensoren

Letztendlich sollte vor allem eine Verknüpfung mehrerer Methoden, d. h. in diesem Fall bildanalytischer Systeme, zu einer effektiveren Krankheitserkennung führen können. Diesen Schritt gingen BRAVO et al. (2004) bei ihren Untersuchungen von Gelbrostinfektionen an Weizenblättern. Bei ihren spektralen Messungen lag der Schwachpunkt bei der Erkennung kranker Pflanzen, die in 12,75% der Fälle als gesund detektiert wurden. Bei der Chlorophyllfluoreszenzmessung wiederum wurden 28,57% der gesunden Pflanzen fälschlicherweise als krank detektiert. Bei einem Prototyp wurden beide Messungen integriert und deckungsgleiche Aufnahmen des Bestandes aufgenommen. Beide Messungen wurden zunächst für sich separat ausgewertet. Die spektralen Aufnahmen wurden nach Vorverarbeitungsschritten mittels quadratischer Diskriminanzanalyse analysiert, wobei letztendlich drei Wellenlängenbereiche integriert wurden und eine Fehlerquote von ca. 10% vorlag. Die Chlorophyllfluoreszenzmessungen beruhten auf zwei Fluoreszenzbildern (550 und 690 nm) und zeigten im Wert eines Läsionindexes (vgl. Kap. 4.3.2) Unterschiede zwischen gesunden und kranken Beständen. Bei dieser Methode lag der Detektionsfehler bei ca. 25%. Zur Fusion beider Methoden gingen diese Werte in einen gemeinsamen Datenpool ein, dessen Auswertung wiederum mittels quadratischer Diskriminanzanalyse eine enorme Verbesserung der

Detektionsgenauigkeit zeigte. Durch Kombination der Methoden verringerte sich der durchschnittliche Klassifizierungsfehler auf 4-5%.

Möglicherweise führt auch die Anwendung Neuronaler Netze zu Verbesserungen in der *Fusarium*-Detektion. MOSHOU et al. (2004) konnten bei einer Gelbrosterkrankung bei Weizenblättern eine zu 99% richtige Klassifizierung von Spektren gesunder und infizierter Bestände auf Grundlage von vier Wellenlängen erreichen.

Auch für die Erkennung *Fusarium*-infizierter Weizenpflanzen könnte die Effektivität und Genauigkeit durch eine Kombination von CFA und (multi)spektraler Bildanalyse erhöht werden; einerseits hinsichtlich einer frühzeitigen Erkennung, andererseits hinsichtlich der Fehlerquote. Wie die vorliegende Studie zeigte, ist die Chlorophyllfluoreszenzanalyse hinsichtlich des frühestmöglichen Erkennungszeitpunktes den reflexionsbasierten, spektralen Methoden überlegen. Erst bei visuell sichtbaren Symptomen kann die Hyperspektralanalyse in dem Bereich, wie er in der Arbeit verwendet wurde, die Erkrankung detektieren. Die Aufnahme von F_v/F_m für die CFA benötigt eine vorherige kurzzeitige Abdunklung, während der Wert $F_m' - F_v/F_m'$ diese nicht voraussetzt und möglicherweise für einen Feldeinsatz eine Option wäre. Die zytologischen Untersuchungen von *Fusarium*-Infektionsverläufen bei den zur Zeit gängigen Weizensortenlinien zeigten, dass für die Entwicklung und Anwendung neuer Pflanzenschutzmittel die frühzeitige Krankheitserkennung essentiell ist (BROWN et al. 2010). Es sollen solche Pestizide zur Anwendung kommen, die in der Erstinfektionsphase greifen und vielleicht eine Schädigung durch Hyphenausbreitung verhindern könnten. Dieses Ziel könnte durch die CFA erreichbar werden.

Als zeitabhängige Messung setzt die CFA dennoch Grenzen für die Geschwindigkeit der Messung. Die HSA wiederum hat den Nachteil, dass sie erst mit Erscheinen der Symptome die Krankheit erkennen kann. Könnten beide Methoden die *Fusarium*-erkrankten Ähren kombiniert aufnehmen und auswerten, müsste sich der Grad der Detektionsgenauigkeit ähnlich den Untersuchungen von BRAVO et al. (2004) noch erhöhen. Unsere Untersuchungen ergaben ein Detektionszeitfenster von ca. 10 Tagen, in dem beide Methoden greifen und sich ergänzen würden.

Will man eine bildanalytische Erkennung von Partieller Taubährigkeit im Anfangsstadium auf dem Feld erreichen, so wird man um eine zusätzliche Überfahrt des Bestandes nicht umhin kommen, egal ob CFA oder HSA oder beides genutzt wird. Die letzte Stickstoffdüngung erfolgt noch vor dem Ährenschieben, die letzten Fungizidbehandlungen gegen Rost- bzw. Fusariumpilze sind im BBCH 61-69 (PFLANZENSCHUTZDIENSTE DER LÄNDER BRANDENBURG, SACHSEN UND THÜRINGEN, 2011). Pflanzenbauliche bzw. phytosanitäre Maßnahmen sind zum Zeitpunkt der visuellen bzw. bildanalytischen Erkennung im BBCH 75/77 zum jetzigen Wissensstandpunkt nicht mehr sinnvoll. Umso mehr wäre der Einsatz einer Befallskarte, die im Vorfeld zur getrennten Beerntung erstellt wurde, zur Vermeidung von Kontaminationen mit *Fusarium*-Toxinen denkbar und erfolgversprechend.

4.3.4 Zukunftsvisionen

Mit dieser Arbeit wurden die Möglichkeiten von Chlorophyllfluoreszenz und hyperspektraler Bildanalyse zur Erkennung eines *Fusarium*-Befalls evaluiert und die beiden Methoden den Erfordernissen einer *Fusarium*-Detektion angepasst. Damit wurden

die Voraussetzungen geschaffen, mit diesen zwei Methoden – möglichst in gekoppelter Form –, *Fusarium* unter Feldbedingungen zu erkennen.

Dazu müssen folgende Schritte in einem weiteren Folgeprojekt angegangen werden:

1) Bau eines Sensors, der beide Methoden (CFA und spektrale Aufnahmen) parallel verwenden kann. Das heißt, die Entwicklung eines Kamerasensors, der durch integrierte Filter mindestens die zwei entsprechend gefundenen Wellenlängenbereiche aufnehmen kann. Ein feldtaugliches Messgerät zur Aufnahme verschiedener Parameter der Chlorophyllfluoreszenzkinetik muss integriert werden.

2) Beide Techniken könnten dabei gerätetechnisch so gekoppelt werden, dass paralleles Messen möglich ist. Wichtig sind entweder deckungsgleiche Bildausschnitte der erkrankten Ähren, um die Informationen der CFA und HSA gemeinsam auswerten zu können oder eine nachträgliche Verknüpfung der Ergebnisse von CFA und HSA.

3) Die verarbeiteten Bildanalysedaten müssen mit den GPS-Daten verknüpft werden. Wichtig dabei sind die synchrone Aufnahme der Bildanalyse- und GPS-Daten und die gleichen Austauschformate der verschiedenen Datenpools.

Fragen der Wirtschaftlichkeit sind bislang noch nicht untersucht worden. Wie häufig und in welcher Messpunktdichte muss unter Feldbedingungen gemessen werden, um Befallsklassen mit beispielsweise einem DON-Gehalt $>1250 \mu\text{g/kg}$ differenzieren zu können? Ist diese Messpunktdichte punkt- oder flächengenau mit GPS zu korrelieren? Welche Kosten entstehen und ist beim Verkauf der besseren Qualität mit einer Gewinnerhöhung zu rechnen. Dies würde die Einführung dieser bildanalytischen Techniken in der Produktion fördern und beschleunigen.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit steht unter dem Titel „Messtechnische Möglichkeiten zur Ermittlung Partieller Taubähigkeit bei Winterweizen mittels Chlorophyllfluoreszenz- und hyperspektraler Bildanalyse“. Hintergrund dieser Arbeit sind die bislang noch fehlenden Sensoren, die mithilfe bildanalytischen Erkennungsmethoden Partielle Taubähigkeit auf dem Feld erfassen. Wäre es möglich, schon auf dem Feld eine *Fusarium*-Erkrankung zu detektieren, könnten gezielt im Ernteverfahren befallene Getreidepartien getrennt beerntet und einer anderen Nutzung als zur Ernährung zugeführt werden.

Zwei Erfolg versprechende Methoden, die Chlorophyllfluoreszenz- und die hyperspektrale Bildanalyse, wurden speziell zur Erkennung dieser Krankheit genutzt.

Die einzelnen Ziele dieser Arbeit waren:

- Identifizierung und Quantifizierung der Befallsgrade unter kontrollierten Bedingungen zu einem optimalen Erkennungszeitpunkt (Chlorophyllfluoreszenzanalyse - CFA, Hyperspektralanalyse - HSA)

- Identifizierung und Quantifizierung der Befallsgrade unter kontrollierten Bedingungen im Zeitverlauf, um ein mögliches Zeitfenster zur Befallserkennung zu definieren (CFA, HSA)
- Identifizierung und Quantifizierung der Befallsgrade unter Freilandbedingungen zu einem optimalen Erkennungszeitpunkt (CFA)
- Entwicklung eines schnellen Auswertalgorithmus` aus einer komplexen Spektrbreite der HSA
- Entwicklung eines Auswertalgorithmus`, der die räumliche Variabilität der photosynthetischen Aktivität bei *Fusarium*-Befall berücksichtigt

Anhand von im Gewächshaus angezogenen und künstlich mit *Fusarium culmorum* inokulierten Weizenpflanzen konnten die methodischen und auswertespezifischen Untersuchungen durchgeführt werden. Der Entwicklungsstand und der Befallsgrad sowohl gesunder als auch *Fusarium*-infizierter Ähren wurden nach WALTHER et al. (2000) bonitiert. Die Chlorophyllfluoreszenz-Bildanalysen wurden mit einer FluorCam 700 MF (PSI, Brno, Tschechische Republik) durchgeführt. Das F_v/F_m -Verhältnis (photosynthetische Effizienz) und dessen räumliche Ungleichverteilung wurden genutzt, um den Effekt des Krankheitsgrades auf die photosynthetische Aktivität zu ermitteln. Mit dieser Methode ist eine sehr frühzeitige Erkennung möglich, da eine Verringerung der photosynthetischen Effizienz bei den kranken Ähren zwischen dem 6. und 11. Tag nach Inokulation festgestellt wurde. Der Befallsgrad korreliert mit der photosynthetischen Effizienz. Die Berechnung des kumulativen F_v/F_m bei 0,3 führte zu einer sehr effektiven und genauen Erkennung der Partiiellen Taubähigkeit ab einem Befallsgrad von mindestens 5% und einer Differenzierungsgenauigkeit von 10%.

Gleichzeitig zu den Chlorophyllfluoreszenz-Bildanalysen wurden Hyperspektralaufnahmen durchgeführt. Für die hyperspektrale Bildanalyse wurde ein am Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam entwickeltes Labormesssystem genutzt. Zeitreihen von gesunden und künstlich infizierten Ähren wurden in einem Wellenlängenbereich von 400-1000 nm aufgenommen. Mittels Bildanalyse-Software ENVI wurden krankheitsspezifische spektrale Signaturen bestimmt. Als geeignete Klassifizierungsmethode erwies sich der Spectral Angle Mapper (SAM), mit dem gesundes und krankes Ährgewebe klar unterschieden werden konnte.

Darüber hinaus wurden mittels PCA 4 Wellenlängenbereiche gefunden, mit denen kranke und gesunde Ähren(bereiche) unterschieden werden können. Ein neu entwickelter head-blight-Index (HBI), der zwei schmale Spektrbereiche mit insgesamt 20 nm verrechnet, könnte die Basis für eine schnelle Krankheitserkennung werden. Bei Berücksichtigung des optimalen Erkennungszeitpunktes (BBCH 65 bis 75/77) wird eine mittlere Abweichung von dem zugrunde gelegten Befallsboniturfehler von 2-3% erreicht.

Für die Weiterentwicklung des Ansatzes wurde die Chlorophyllfluoreszenz-Bildanalyse unter Freilandbedingungen getestet. Bei Einhaltung der Rahmenbedingungen (keine direkte Sonneneinstrahlung) war ebenfalls eine *Fusarium*-Erkennung möglich, wenn auch mit schlechteren Korrelationen.

6 Summary

The present paper is entitled „Metrological potentialities in the detection of *Fusarium* head blight on winter wheat by means of chlorophyll fluorescence and hyperspectral imaging”. The motivation behind this study was the lack of effective sensors and imaging methods to determine *Fusarium* head blight in the field. If it is possible to detect *Fusarium* infections in the field, batches of infected grain could be harvested selectively and supplied to an alternative utilisation other than to human or animal nutrition.

Two promising methods, chlorophyll fluorescence and hyperspectral imaging, were used for the detection of this disease.

In particular the aims of this paper were:

- Identification and quantification of the degrees of infection under controlled conditions at an optimal point of time (chlorophyll fluorescence analysis - CFA, hyperspectral analysis - HSA)
- Identification and quantification of the temporal dynamics of the degrees of infection under controlled conditions to define effective time frame for the determination of infection (CFA, HSA)
- Identification and quantification of the degrees of infection under outdoor conditions at an optimal point of time (HSA)
- Development of a rapid evaluation algorithm from a whole complex spectra of the HSA
- Development of an evaluation algorithm considering the spatial variability of the photosynthetic activity due to the *Fusarium* infection

The methodical and evaluating analyses were performed on the basis of greenhouse grown wheat plants, which were artificially inoculated with *Fusarium culmorum*. The state of development and the degree of infection of healthy as well as *Fusarium*-infected ears were rated after WALTHER et al. (2000). The chlorophyll fluorescence imaging was performed with a FluorCam 700 MF (PSI, Brno, Czech Republic). To determine the effect of the degree of disease on the photosynthetic activity, the F_v/F_m -ratio (photosynthetic efficiency) and its spatial uneven distribution was evaluated. With this method, a very early head blight detection was possible because the photosynthetic efficiency of infected ears considerably decreased between the sixth and eleventh day after inoculation. The degree of infection correlated with the photosynthetic efficiency. At a degree of 5%, and higher, calculation of the cumulative F_v/F_m at 0.3 led to a very effective and precise determination of *Fusarium* head blight with a differentiation accuracy of at least 10%.

Concomitant with the chlorophyll fluorescence imaging, hyperspectral images were obtained. A laboratory hyperspectral system, developed at the Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam, was used for this purpose. Time series of healthy and artificially infected ears were taken in a wavelength range of 400-1000 nm. By means of the imaging software ENVI, disease specific spectral signatures could be determined. The Spectral Angle Mapper (SAM) proved to be an appropriate classification method to clearly distinguish healthy and infected ear tissues.

Further, by means of PCA, four wave length ranges were found, which enable to distinguish infected and healthy areas of wheat ears. A newly developed head-blight index (HBI), which computes two narrow spectral ranges of total 20 nm with one another, could be the basis for rapid disease detection. Within the optimal head blight detection period from BBCH 65 to BBCH 75/77, a very low mean infection rating error of 2 to 3% was achieved.

For a further development of this approach the chlorophyll fluorescence imaging was tested under field conditions. In compliance with the boundary conditions (no direct solar irradiation), *Fusarium* detection was also possible, although with lower correlations.

7 Literaturverzeichnis

AID (Hrsg.), 1990: Pilzgifte im Futter, AID-Informationen, Pressedienst 39 (25): 19 S.

Aldea, M., Frank, T.D., DeLucia, E.H., 2006: A method for quantitative analysis of spatially variable physiological processes across leaf surfaces. *Photosynthesis Research* 90: 161-172.

Anonymus, 2011a: <http://www.chemie.de/lexikon/Zearalenon.html>. Verfügbar am: 14. Juni 2011.

Anonymus, 2011b: Kernspintomographie. <http://www.radiologie-idar-oberstein.com/html/kernspintomographie1.html>. Verfügbar am: 10. September 2011.

Ariana, D., Guyer, D.E., Shrestha, B., 2006: Integrating multispectral reflectance and fluorescence imaging for defect detection on apples. *Computers and Electronics in Agriculture* 50: 148-161.

Aristizábal, I.D., 2007: La resonancia magnética y sus aplicaciones en la agroindustria, una revisión. *Revista de la Facultad Nacional de Agronomía – Medellín* 60(2): 4037-4066.

Atkins, P.W., De Paula, J., 2006: *Physikalische Chemie*. Wiley-VCH, 1188 S.

Bailey, G.F., Horvat, R.J., 1972: Raman spectroscopic analysis of cis-trans isomer composition of edible vegetable oils. *Journal of American Oil Chemists Society* 49(8): 494.

Baker, N.R., 1991: A possible role for photosystem II in environmental perturbations of photosynthesis. *Physiologia Plantarum* 81: 563-570.

Baker, N.R., Oxborough, K., Lawson, T., Morison, J.I.L., 2001: High resolution imaging of photosynthetic activities of tissues, cells and chloroplasts in leaves. *Journal of Experimental Botany* 52(356): 615-621.

Baker, N.R.; Rosenqvist, E., 2004: Application of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany* 55: 1607-1621.

Balachandran, S., Osmond, C.B., Daley, P.F., 1994: Diagnosis of the earliest strain-specific interactions between tobacco mosaic-virus and chloroplasts of tobacco-leaves in-vivo by means of chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Physiology* 104(3): 1059-1065.

Baranowski, P., Mazurek, W., Witkowska-Walczak, B., Sławiński, C., 2009: Detection of early apple bruises using pulsed-phase thermography. *Postharvest Biology and Technology* 53(3): 91-100.

Baret, F., Guyot, G., Major, D., 1988: Coupled fluorescence and reflectance measurements to improve crop productivity evaluation. In: Lichtenthaler, H.K. (Hrsg.): *Application of chlorophyll fluorescence*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands: 319-324.

Barreiro, P., Zheng, C., Sun, D.W., Hernandez-Sanchez, N., Perez-Sanchez, J.M., Ruiz-Cabelloc, J., 2008: Non-destructive seed detection in mandarins: comparison of automatic threshold methods in FLASH and COMSPIRA MRIs. *Postharvest Biology and Technology* 47(2): 189-198.

Bartels, G., Rodemann, B., 2003: Strategien zur Vermeidung von Mykotoxinen im Getreide. *Gesunde Pflanzen* 55(5): 125-135.

Bauer, H., Plattner, K., Volgger, W., 2000: Photosynthesis in Norway spruce seedlings infected by the needle rust *Chrysomyxa rhododendri*. *Tree Phys.* 20: 211-216.

Bauer, S.D., Korč, F., Förstner, W., 2009: Investigation into the classification of diseases of sugar beet leaves using multispectral images. In: van Henten, E.J., Goense, D., Lokhorst, C. (Hrsg.), *Precision agriculture '09. Proceedings of the Joint International Agricultural Conference*. Wageningen: Academic Publishers, S. 203-210.

Bauriegel, E., Giebel, A., Herppich, W.B., 2010: Rapid *Fusarium* head blight detection on winter wheat ears using chlorophyll fluorescence imaging. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 83(2): 196-203.

Bauriegel, E., Giebel, A., Geyer, M., Schmidt, U., Herppich, W.B., 2011a: Early detection of *Fusarium* infection in wheat using hyper-spectral imaging. *Computers and Electronics in Agriculture* 75: 304–312.

Bauriegel, E.; Giebel, A.; Herppich, W.B., 2011b: Hyperspectral and chlorophyll fluorescence imaging to analyse impacts of *Fusarium culmorum* on photosynthetic integrity of infected wheat ears. *Sensors* 11 (4): 3765-3779.

Becker, B.L., Lusch, D.P., Qi, J.G., 2007: A classification-based assessment of the optimal spectral and spatial resolutions for Great Lakes coastal wetland imagery. *Remote Sensing of Environment* 108(1): 111-120.

Benito, M.T.J., Ojeda, C.B., Rojas, F.S., 2008: Process analytical chemistry: Applications of near infrared spectrometry in environmental and food analysis: An overview. *Applied Spectroscopy Reviews* 43(5): 452-484.

Bilger, W., Fisahn, J., Brummet, W., Kossmann, J., Willmitzer, L., 1995: Violaxanthin cycle pigment contents in potato and tobacco plants with genetically reduced photosynthetic capacity. *Plant Physiology* 108: 1479-1486.

BLE, 2011: Kulturdatenblatt Weizen.

<http://www.oekolandbau.de/erzeuger/pflanzenbau/getreide/kulturdatenblatt-weizen>.

Verfügbar am: 06. August 2011.

Böhrnsen, A., 2004: Das Lasersystem MiniVeg N von Fritzmeier: Laserlicht lässt Pflanzen leuchten. http://www.fritzmeier.de/dt/Group/02_News/presse_download/profi_12-2004.pdf. Verfügbar am: 18. Juli 2011.

Bonfig, K.B., Schreiber, U., Gabler, A., Roitsch, T., Berger, S., 2006: Infection with virulent and avirulent *P. syringae* strains differentially affects photosynthesis and sink metabolism in *Arabidopsis* leaves. *Planta* 225: 1-12.

Bravo, C., 2006: Automatic foliar disease detection in winter wheat. Dissertation Universität Leuven, Niederlande: 258 S.

Bravo, C., Moshou, D., West, J., McCartney, A., Ramon, H., 2003: Early disease detection in wheat fields using spectral reflectance. *Biosystems Engineering* 84: 137-145.

Bravo, C., Moshou, D., Oberti, R., West, J., McCartney, A., Bodria, L., Ramon, H., 2004: Foliar disease detection in the field using optical sensor fusion. *Agricultural Engineering International: the CIGR Journal of scientific research and development*. Manuscript FP 04 008. Vol. 6, Proceedings of the Joint International Agricultural Conference. Wageningen, The Netherlands: Academic Publishers, 14 p.

Brown, R.B., Steckler, J.P., 1993: Prescription maps for herbicide spayer control. Paper American Society of Agricultural Engineers 93-1070: 18p.

Brown, N.A., Urban, M., van de Meene, A.M.L., Hammond-Kosack, K. E., 2010: The infection biology of *Fusarium graminearum*: Defining the pathways of spikelet to spikelet colonisation in wheat ears. *Fungal Biology* 114: 555-571.

Bürling, K., Hunsche, M., Noga, G., 2010: Quantum yield of non-regulated energy dissipation in PSII (Y(NO)) for early detection of leaf rust (*Puccinia triticina*) infection in susceptible and resistant wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Precision Agriculture* 11: 703-716.

Buschmann, C., Bilke, S., Butterer, A., Enk, A., Längle, T., Wenzel, O., Lichtenthaler, H.K., 1999: Einfluß von Trockenstreß auf die Photosyntheseaktivität verschiedener Ökotypen der Buche (*Fagus sylvatica* L.) – Unterschiede in der Trockenstressempfindlichkeit. Berichtsreihe zum Statusseminar der Baden-Württemberg-Projekträgerchaft „Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung“ (BW-PLUS), FZKA-BWPLUS 15, Diskussionskreis, Leopoldshafen: 1-12.

Castillejo-Gonzalez, I.L., Lopez-Granados, F., Garcia-Ferrer, A., Peña-Barragán, J.M., Jurado-Expósito, F., Sánchez de la Ordena, M., González-Audicanac, M., 2009: Object- and pixel-based analysis for mapping crops and their agro-environmental associated measures using QuickBird imagery. *Computers and Electronics in Agriculture* 68(2): 207-215.

Chaerle, L., van der Straeten, D., 2000: Imaging techniques and the early detection of plant stress. *Trends in Plant Science* 5(11): 495-501.

Chaerle, L., van der Straeten, D., 2001: Seeing is believing: imaging techniques to monitor plant health. *Biochimica et Biophysica Acta – Gene Structure and Expression* 1519 (3): 153-166.

Chaerle, L., de Boever, F., van Montagu, M., van der Straeten, D., 2001: Thermographic visualization of cell death in tobacco and *Arabidopsis*. *Plant Cell and Environment* 24(1): 15-25.

Chaerle, L., Hagenbeek, D., De Bruyne, E., Valcke, R., van der Straeten, D., 2004: Thermal and chlorophyll-fluorescence imaging distinguish plant-pathogen interactions at an early stage. *Plant and Cell Physiology* 45(7): 887-896.

Chaerle, L., Hulsen, K., Hermans, C., Strasser, R.J., Valcke, R., Hofte, M., van der Straeten, D., 2003: Robotized time-lapse imaging to assess in-plant uptake of phenylurea herbicides and their microbial degradation. *Physiologia Plantarum* 118: 613-619.

Chaerle, L., Pineda, M., Romero-Aranda, R., van der Straeten, D., Barón, M., 2006: Robotized thermal and chlorophyll fluorescence imaging of pepper mild mottle virus infection in *Nicotiana benthamiana*. *Plant and Cell Physiology* 47: 1323-1336.

Chaerle, L., Hagenbeek, D., De Bruyne, E., van der Straeten, D., 2007a: Chlorophyll fluorescence imaging for disease-resistance screening of sugar beet. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 91: 97-106.

Chaerle, L., Leinonen, I., Jones, H.G., van der Straeten, D., 2007b: Monitoring and screening plant populations with combined thermal and chlorophyll fluorescence imaging. *Journal of Experimental Botany* 58(4): 773-784.

Chayaprasert, W., Strohshine, R., 2005: Rapid sensing of internal browning in whole apples using a low-cost, low-field proton magnetic resonance sensor. *Postharvest Biology and Technology* 36(3): 291-301.

Chen, Y.-R., Chao, K., Kim, M.S., 2002: Machine vision technology for agricultural applications. *Computers and Electronics in Agriculture* 36: 173-191.

Cséfalvai, L., Di Gaspero, G., Matouš, K., Bellin, D., Ruperti, B., Olejníčková, J., 2009: Pre-symptomatic detection of *Plasmopara viticola* infection in grapevine leaves using chlorophyll fluorescence imaging. *European Journal of Plant Pathology* 125: 291-302.

Daley, P.F., 1995: Chlorophyll fluorescence analysis and imaging in plant stress and disease. *Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne de Phytopathologie* 17: 167-173.

Dammer, K.-H., Moeller, B., Rodemann, B., Heppner, D., 2011: Detection of head blight (*Fusarium* spp.) in winter wheat by color and multispectral image analyses. *Crop Protection* 30(4): 420-428.

Dänicke, S., Valenta, H., Ueberschär, K.-H., 2006: *Fusarium*-Toxine. In: Flachowsky, G. (Hrsg.): Möglichkeiten der Dekontamination von „Unerwünschten Stoffen nach Anlage 5 der Futtermittelverordnung (2006)“. Sonderheft 294. *Landbauforschung Völkenrode*: 169-201.

Demmig-Adams, B., Adams, W.W., Barker, D.H., Logan, B.A., Bowling, D.R., Verhoeven, A.S., 1996: Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation *Physiologia Plantarum* 98(2): 253-264.

Denffer, D., Ziegler, H., Ehrendorfer, F., Bresinsky, A., 1983: Strasburger. *Lehrbuch der Botanik*, Gustav-Fischer-Verlag Jena: 1161 S.

Delwiche, S.R., 2003: Classification of scab- and other mold-damaged wheat kernels by near-infrared reflectance spectroscopy. *Transactions of the ASAE* 46: 731-738.

Devadas, R., Lamb, D.W., Simpfendorfer S., Backhouse D., 2009: Evaluating ten spectral vegetation indices for identifying rust infection in individual wheat leaves. *Precision Agriculture* 10(6): 459-470.

Dippel, B., 2011: Grundlagen, Techniken und Anwendungen zur Raman-Spektroskopie. <http://www.raman.de>. Verfügbar am: 14. Juni 2011.

Dittié, G., 2011a: Physik der Thermographie. <http://www.thermografie.de/physik.htm>. Verfügbar am: 6. Juni 2011.

Dittié, G., 2011b: Die Thermographiekamera. <http://www.thermografie.de/kamera.htm>. Verfügbar am: 6. Juni 2011.

Ditz, M., Egert, V., Idler, C., Lewitzka, F., Kumke, M., Rasch, C., Walte, A., 2011: Indikatoren und Sensortechnik zur Erkennung von Mykotoxinbildnern in der Getreideaufbereitung. In: Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim (Hrsg.): Erschließung von Nachhaltigkeitspotenzialen durch Nutzung innovativer Sensortechnologien - Prozesskette Getreide. Bornimer Agrartechnische Berichte 74. Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim: 67-177.

DLG-Arbeitsgruppe „Mykotoxine“, 2000: Mykotoxine vermeiden statt „bekämpfen“. Sonderdruck DLG-Mitteilungen 8. <http://www.dlg.org/uploads/media/myko.pdf>. Verfügbar am 1. März 2010.

Dowell, F.E., Ram, M.S., Seitz, L.M., 1999: Predicting scab, vomitoxin, and ergosterol in single wheat kernels using near-infrared spectroscopy. *Cereal Chemistry* 76(4): 573-576.

Duszek, D.A., 1987: Infrared thermometry of leaf temperature measurements and common root rot of spring wheat and spring barley. *Plant Soil* 101: 287-290.

ENVI, 2010: Tutorial: Selected Hyperspectral Methods. www.creaso.com. Verfügbar am: 1 Juli 2010.

ENVI, 2005: ENVI User's Guide. Research Systems, Inc., USA: 1202 S.

Firtha, F., Fekete, A., Kaszab, T., Gillay, B., Nogula-Nagy, M., Kovács, Z., Kantor, D.B., 2008: Methods for improving image quality and reducing data load of NIR hyperspectral images. *Sensors* 8: 3287-3298.

Förschler, A., Portz C., Steiner, U., Schmitz-Eiberger, M., Noga, G., 2003: Minderung von pilzlichem Pathogenbefall im organischen Obstbau durch Zufuhr von Antioxidantien. Landwirtschaftliche Fakultät Universität Bonn, Schriftenreihe Lehr- und Forschungsschwerpunktes USL: 113: 41 S.

Foerster, J., Herppich, W.B., Zsom-Muha, V., Felföldi, J., 2009: Non-destructive evaluation of apple mealiness. Book of Abstracts of the COST ACTION 924 International Conference: Environmentally Friendly and Safe Technologies for Quality of Fruits and Vegetables, Faro, Portugal 14.-16.01.2009. p. 20.

Forstreuter, M., Schröder, R., Herppich, W.B., 2006: Chlorophyllfluoreszenzbildanalyse zur raschen Indikation des Befalls von Laub- und Nadelbäumen durch herbivore Insekten. Bornimer Agrartechnische Berichte 56: 26-33.

Franke, J., Menz, G., 2007: Multi-temporal wheat disease detection by multi-spectral remote sensing. Precision Agriculture 8: 161-172.

Franke, J., Menz, G., Oerke, E.-C., Rascher, U., 2005: Comparison of multi- and hyperspectral imaging data of leaf rust infected wheat plants. In: Owe, M., D'Urso, G. (Hrsg.), Remote sensing for agriculture, ecosystems and hydrology VII. Proceeding of SPIE Vol. 5976: 349-359.

Fitzgerald, G., Rodriguez, D., O'Leary, G., 2010: Measuring and predicting canopy nitrogen nutrition in wheat using a spectral index - The canopy chlorophyll content index (CCCI). Field Crops Research 116: 318-324.

Fritzmeier, U., 2008: Hightech-Lösungen für die Landwirtschaft. Technik in Bayern 1: 12-13.

Gelderblom, W.C.A., Jaskiewicz, K., Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Horak, R.M., Vleggar, R., Kriek, N.P.J., 1988: Fumonisin - Novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. Applied and Environmental Microbiology 54(7): 1806-1811.

Gitelson, A.A., Gritz, Y., Merzlyak, M.N., 2003: Relationships between leaf chlorophyll content and spectral reflectance and algorithms for non-destructive chlorophyll assessment in higher plant leaves. Journal of Plant Physiology 160: 271-282.

Gödecke, R., von Tiedemann, A., 2010: Einflussfaktoren der spezifischen Mykotoxinbildung in Weizen. 57. Deutsche Pflanzenschutztagung "Gesunde Pflanze - gesunder Mensch". Julius-Kühn-Archiv 428: S. 69.

Goodman, B.A., Williamson, B., Chudek, A., 1992: Non-invasive observation of the development of fungal infection in fruit. Protoplasma 166: 107-109.

Häuser-Hahn, I., 2005: Focus on *Fusarium* at BCS research & development. Präsentation auf dem Fusariumsymposium Monheim.
http://www.press.bayercropscience.com/bcsweb/cropprotection.nsf/id/FS05_FoconFusateBCSRD_EN. Verfügbar am: 20. Januar 2010.

Haggar, R.J., Stent, C.J., Isaac, S., 1983: A prototype hand-held patch sprayer for killing weeds, activated by spectral differences in crop/weed canopies. Journal of Agricultural Engineering Research 28: 349-358.

Halloin, J.M., Cooper, T.G., Potchen, E.J., 1992: A study of disease development in *Rhizoctonia solani* infected sugarbeets, using magnetic resonance imaging. Annual Meeting of the American Phytopathological Society, Portland, Oregon, USA, August 8-12, Phytopathology. Phytopathology 82(10): 1160.

Hellebrand, H.J., Herppich, W.B., Beuche, H., Dammer, K.-H., Linke, M., Flath, K., 2006: Investigations of plant infections by thermal vision and NIR imaging. *International Agrophysics* 20(1): 1-10.

Hehmke, M., Dammer, K.-H., Herppich, W.B., Hellebrand, J., Beuche, H., Rodemann, B., 2007: Digital image analysis for detection of head blight (*Fusarium* spp.) in winter wheat. In: Bleiholder, H. (Hrsg.): *Proceedings of the International Symposium. Agricultural Field Trials - Today and Tomorrow*. Grauer, Stuttgart: 56-61.

Hernández-Sánchez, N., Barreiro, P., Ruiz-Cabello, J., 2006: On-line identification of seeds in mandarins with magnetic resonance imaging. *Biosystems Engineering* 95(4): 529–536.

Hernández-Sánchez, N., Hills, B.P., Barreiro, P., Marigheto, N., 2007: An NMR study on internal browning in pears. *Postharvest Biology and Technology* 44(3): 260-270.

Hernández-Sánchez, N., Barreiro-Elorza, P., Ruiz-Cabello, J., 2009: Nuclear magnetic resonance for internal quality evaluation in horticultural products. In: Sun, D.-W. (Hrsg.), *Optical Monitoring of Fresh and Processed Agricultural Crops*. Contemporary Food Engineering Series. CRC Press.

Herppich, W.B., 2001: Einsatzmöglichkeiten der Chlorophyllfluoreszenzbildanalyse in der gartenbaulichen Forschung. *Bornimer Agrartechnische Berichte* 26: 91-104.

Herppich W.B., 2002: Application potential of chlorophyll fluorescence imaging analysis in horticultural research. In: Zude, M., Herold, B., Geyer, M. (Hrsg.): *Fruit, Nut and Vegetable Production Engineering*. Proceedings of the 6th International Symposium. Institut für Agrartechnik Bornim e.V., Potsdam: 609-614.

Herppich, W.B., Linke, M., Landahl, S., Gzik, A., 2001: Preharvest and postharvest responses of radish to reduced water supply during growth. *Acta Horticulture* 553: 89-90.

Herppich, W.B., Hetz, E., Dammer, K.-H., Langner, H.-R., Beuche, H., Hellebrand, H.-J., 2005: Einsatzmöglichkeiten der Chlorophyllfluoreszenzbildanalyse zur Erkennung und Bewertung von pilzlichem Pathogenbefall. *Bornimer Agrartechnische Berichte* 40: 95-108.

Herppich, W.B., Foerster, J., Zeymer, J., Geyer, M., Schlüter, O., 2009: Application of chlorophyll fluorescence imaging in non-destructively monitoring postharvest quality changes. Cost Action 924. Proceedings of the International Conference: Environmentally Friendly and Safe Technologies for Quality of Fruits and Vegetables, Faro, Portugal, 14.-16.1.2009: 47-53 (im Druck).

Hills, B.P., Clark, C.J., 2003: Quality assessment of horticultural products by NMR. *Annual Reports of NMR Spectroscopy* 58: 177-230.

Ibarra-Castanedo, C., Piau, J.-M., Guilbert, S., Avdelidis, N.P., Genest, M., Abdelhakim Bendada, A., Xavier P. V. Maldague, X.P.V., 2009: Comparative Study of Active Thermography Techniques for the Nondestructive Evaluation of Honeycomb Structures. *Research in Nondestructive Evaluation* 20: 1-31.

Jacobi, J., Backes, M., Kuehbauch, W., Plumer, L., 2006: Identification of weeds in remote-sensed imaged on the basis of differences in spectral reflectance. *Journal of Diseases and Protection* 20: 241-248.

Johnson, G.A., Bailey, J.E., Bruck, R.I., Matyac, C.A., 1986: Studies of diseased root tissue using nuclear magnetic resonance imaging. *Phytopathology* 76(10): 1067.

Jones, H.G., 1992: *Plants and microclimate. A quantitative approach to environmental plant physiology.* Cambridge University Press, Cambridge, Massachusetts: 428 S.

Jones, H.G., 2004: Application of thermal imaging and infrared sensing in plant physiology and ecophysiology. *Advances in Botanical Research* 41: 108-163.

Kang, Z., Buchenauer, H., 1999: Immunochemical localization of fusarium toxins in infected wheat spikes by *Fusarium culmorum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 275-288.

Kang, Z., Buchenauer H., 2000a: Cytology and ultrastructure of the infection of wheat spikes by *Fusarium culmorum*. *Mycological Research* 104: 1083-1093.

Kang, Z., Buchenauer, H., 2000b: Ultrastructural and immunocytochemical investigation of pathogen development and host responses in resistant and susceptible wheat spikes infected by *Fusarium culmorum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57: 255-268.

Kim, M.S., Chen, Y.R., Mehl, P.M., 2001: Hyperspectral reflectance and fluorescence imaging system for food quality and safety. *Transactions of the ASABE* 44(3): 721–729.

Kim, M.S., Milczarek, R., McCarthy, M., 2008: Fast detection of seeds and freeze damage of mandarins using magnetic resonance imaging. *Modern Physics Letters B (MPLB)* 22(11): 941-946.

Kitajima, M., Butler, W.L., 1975: Excitation spectra for photosystem-I and photosystem-II in chloroplasts and spectral characteristics of distribution of quanta between 2 photosystems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics* 408(3): 297-305.

Kramer, D.M., Johnson, G., Kiirats, O., Edwards, G.E., 2004: New fluorescence parameters for the determination of Q_A redox state and excitation energy fluxes. *Photosynthesis Research* 79(2): 209-218.

Kruse, F.A., Lefkoff, A.B., Boardman, J.W., Heidebrecht, K.B., Shapiro, A.T., Barloo, P.J., Goetz, A.F.H., 1993: The Spectral Image Processing System (SIPS) - interactive visualization and analysis of imaging spectrometer data. *Remote Sensing of Environment* 44: 145-163.

Kuckenberger, J., Tartachnyk, I., Schmitz-Eiberger, M., Noga, G., 2007: Early detection of leaf rust and powdery mildew infections on wheat leaves by PAM fluorescence imaging. *Precision Agriculture* 8: 515-521.

Kuckenberger, J., Tartachnyk, I., Noga, G., 2009: Temporal and spatial changes of chlorophyll fluorescence as a basis for early and precise detection of leaf rust and powdery mildew infections in wheat leaves. *Precision Agriculture* 10: 34-44.

Kück, U., Nowrousian, M., Hoff, B., Engh, I., 2009: Schimmelpilze. Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung. Springer-Verlag Berlin: 208 S.

Kuiper-Goodman, T., 1995: Mycotoxins: risk assessment and legislation. *Toxicology Letters* 82/83: 853-859.

Laguet, S., Hollingsworth, C.R., Motteberg, C.D., MacRae, I., 2004: Potentials and limits of remote sensing data for detection of *Fusarium* head blight on hard red spring wheat in Minnesota. In: Mulla, D. J. (Hrsg.): Proceedings of the 7th International Conference on Precision Agriculture and Other Precision Resources Management. Minneapolis, USA: 1196-1203.

Lamb, D.W., Weedon, M., 1998: Evaluating the accuracy of mapping weeds in fallow fields using airborne digital imaging: *Panicum effusum* in oilseed rape stubble. *Weed Research* 38(6): 443-451.

Lamb, D.W., Weedon, M., Rew, L.J., 1999: Evaluating the accuracy of mapping weeds in seedling crops using airborne digital imaging: *Avena* ssp. in seedling triticale. *Weed Research* 39(6): 481-492.

Lancashire, P.D., Bleiholder, H., Vandenboom, T., Langeluddeke, P., Strauss, R., Weber, E., Witzenger, A., 1991: A uniform decimal code for growth-stages of crops and weeds. *Annals of Applied Biology* 119: 561-601.

Landwirtschaftskammer Nordrhein-Westfalen, 2009: Pilzkrankheiten im Wintergetreide. Fungizid-Empfehlungen im Weizen.
<http://www.landwirtschaftskammer.de/landwirtschaft/pflanzenschutz/ackerbau/getreide/wintergetreide-pilzkrankheiten-pdf.pdf>. Verfügbar am: 8. Februar 2011.

LELF (Landesamt für Ländliche Entwicklung, Landwirtschaft und Flurneuordnung Brandenburg), 2010: Sortenratgeber 2010/2011.
http://www.mil.brandenburg.de/sixcms/media.php/4055/Sortenratgeber_Winterweizen_2010_2011.pdf. Verfügbar am: 7. Dezember 2010.

Lenk, S., Chaerle, L., Pfündel, E.E., Langsdorf, G., Hagenbeek, D., Lichtenthaler, H.K., van der Straeten, D., Buschmann, C., 2007: Multispectral fluorescence and reflectance imaging at the leaf level and its possible applications. *Journal of Experimental Botany* 58(4): 807-814.

Lichtenthaler, H.K., 1988: Applications of chlorophyll fluorescence: in photosynthetic research, stress physiology, hydrobiology and remote sensing. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands: 384 S.

Lichtenthaler, H.K., 1994: Spektroskopische Eigenschaften von Pflanzen und ihre Nutzung zur Fernerkundung der Vegetation. *Fridericiana* 49: 25-45.

Lichtenthaler, H.K., Gitelson, A., Lang, M., 1996a: Non-destructive determination of chlorophyll content of leaves of a green and an aurea mutant of tobacco by reflectance measurements. *Journal of Plant Physiology* 148(3-4): 483-493.

Lichtenthaler, H.K., Lang, M., Sowinska, M., Heisel, F., Miehl, J.A., 1996b: Detection of vegetation stress via a new high resolution fluorescence imaging system. *Journal of Plant Physiology* 148: 599-612.

Lienemann, K., 2002: Auftreten von *Fusarium*-Arten an Winterweizen im Rheinland und Möglichkeiten der Befallskontrolle unter besonderer Berücksichtigung der Weizensorte. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn: 151 S.

Lindenthal, M., 2005: Visualisierung der Krankheitsentwicklung von Falschem Mehltau an Gurken durch *Pseudoperospora cubensis* mittels Thermographie. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn: 123 S.

Linke, M., Schlüter, O., Herppich, W.B., Geyer, M., 2005: Re-warming of stone fruits after cold-storage. In: Mencarelli, F., Tonutti, P. (Hrsg.): *Proceedings of the 5th International Postharvest Symposium*. Acta Horticulture 682: 1717-1722.

Liu, Y., Delwiche, S.R., Dong, Y., 2009: Feasibility of FT-Raman spectroscopy for rapid screening for DON toxin in ground wheat and barley. *Food Additives and Contaminants, Part A: Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment* 26(10): 1396-1401.

Lorenzen, B., Jensen, A., 1989: Changes in leaf spectral properties induced in barley by cereal powdery mildew. *Remote Sensing of Environment* 27: 201-209.

Lorenzini, G., Guidi, L., Nali, C., Ciompi, S., Soldatini, G.F., 1997: Photosynthetic response to tomato plants to vascular wilt diseases. *Plant Science* 124: 143-152.

Mahlein, A.-K., Steiner, U., Dehne, H.-W., Oerke, E.-C., 2009: Spectral signatures of diseased sugar beet leaves. In: van Henten, E.J., Goense, D., Lokhorst, C. (Hrsg.), *Precision Agriculture '09. Proceedings of the Joint International Agricultural Conference*. Academic Publishers, Wageningen: 239-246.

Martinez, D.E., Luquez, V.M., Bartoli, C.G., Guamét, J.J., 2003: Persistence of photosynthetic components and photochemical efficiency in ears of water-stressed wheat (*Triticum aestivum*). *Physiologia Plantarum* 119: 519-525.

Massart, F., Saggese, G., 2010: Oestrogenic mycotoxin exposures and precocious pubertal development. *International Journal of Andrology* 33(2): 369-376.

Matouš, K., Benediktyová, Z., Berger, S., Roitsch, T., Nedbal, L., 2006: Case study of combinatorial imaging: What protocol and what chlorophyll fluorescence image to use when visualizing infection of *Arabidopsis thaliana* by *Pseudomonas syringae*? *Photosynthesis Research* 90: 243-253.

Maxwell, K., Johnson, G.N., 2000: Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51: 659-668.

Merrill, A.H., Liotta, D.C., Riley, R.T., 1996: Fumonisin: Fungal toxins that shed light on sphingolipid function. *Trends in Cell Biology* 6(6): 218-223.

Miedaner, T., Schneider, B., Geiger, H.H., 2003. Deoxynivalenol (DON) content and fusarium head blight resistance in segregating populations of winter rye and winter wheat. *Crop Science* 43: 519-526.

Miedaner, T., Schneider, B., 2002: Züchtungsstrategien zur Verringerung von Ährenfusariosen und Mykotoxingehalten bei Getreide. Tagungsband der 13. Wissenschaftlichen Fachtagung der Landwirtschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Lehr- und Forschungsschwerpunkt „Umweltverträgliche und standortgerechte Landwirtschaft“: Fusariumbefall und Mykotoxinbelastung von Getreide – Ursachen, Auswirkungen, Vermeidungsstrategien. Bonn: 55-67.

Mielke, H., 1995: Untersuchungen zur Anfälligkeit verschiedener Weizensorten gegenüber der Partiellen Taubährigkeit (*Fusarium culmorum*) (W. G. Sm.) Sacc.). *Nachrichtenblatt Deutscher Pflanzenschutzdienst* 47(10): 254-262.

MIL (Ministerium für Infrastruktur und Landwirtschaft des Landes Brandenburg), 2010: Mykotoxine. Vorkommen und Bekämpfungsstrategien in Brandenburg. 80 S.

Moshou, D., Bravo, C., West, J., Wahlen, S., McCartney, A., Ramon, H., 2004: Automatic detection of 'yellow rust' in wheat using reflectance measurements and neural networks. *Computers and Electronics in Agriculture* 44: 173–188.

Merzlyak, M. N., Solovchenko, A. E., Smagin, A. I., Gitelson, A. A., 2005: Apple flavonols during fruit adaptation to solar radiation: spectral features and technique for non-destructive assessment. *Journal of Plant Physiology* 162: 151-160.

Muhammed, H.H., Larsolle, A., 2003: Feature vector based analysis of hyperspectral crop reflectance data for discrimination and quantification of fungal disease severity in wheat. *Biosystems Engineering* 86: 125-134.

Nedbal, L., Soukupova, J., Whitmarsh, J., Trtilek, M., 2000a: Postharvest imaging of chlorophyll fluorescence from lemons can be used to predict fruit quality. *Photosynthetica* 38(4): 571-579.

Nedbal L., Trtilek, M., Herppich, W.B., 2000b: Methods and equipment for fluorescence imaging on plant material. *Bornimer Agrartechnische Berichte* 25: 127-135.

Nedbal, L., Whitmarsh, J., 2004: Chlorophyll fluorescence imaging of leaves and fruits. In: Papageorgiou, G.C., Govindjee, X. (Hrsg.): *Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis*. Springer, Netherlands: 389-407.

Neuner, G., Buchner, O., 1999: Assessment of foliar frost damage: a comparison of in vivo chlorophyll fluorescence with other viability tests. *Journal of Applied Botany* 73: 50-54.

Nicolas, H., 2005: Use of remote sensing within the optical and thermal spectral ranges in order to detect *Septoria tritici* on winter wheat. In: Stafford, J. V. (Hrsg.): *Precision*

agriculture '05. Papers presented at the 5th European Conference on Precision Agriculture. Uppsala, Sweden: 81-89.

Nicotra, A.B., Hofmann, M., Siebke, K., Ball, M.C., 2003: Spatial patterning of pigmentation in evergreen leaves in response to freezing stress. *Plant Cell and Environment* 26: 1893-1904.

Nieuwenhuizen, A.T., Hofstee, J.W., van de Zande, J.C., Meuleman, J., van Henten, E.J., 2010: Classification of sugar beet and volunteer potato reflection spectra with a neural network and statistical discriminant analysis to select discriminative wavelengths. *Computers and Electronics in Agriculture* 73(2): 146-153.

Nilsson, H.-E., 1995: Remote sensing and image analysis in plant pathology. *Annual Review of Phytopathology* 15: 489-527.

Nogués, S., Cotxarrera, L., Alegre, L., Trillas, M.I., 2002: Limitations to photosynthesis in tomato leaves induced by *Fusarium* wilt. *New Phytologist* 154: 461-470.

Obst, A. Gehring K., 2002: Getreide. Krankheiten, Schädlinge, Unkräuter. Verlag Th. Mann, Gelsenkirchen: 256 S.

Oerke, E.-C., Steiner, U., Dehne, H.-W., Lindenthal, M., 2006: Thermal imaging of cucumber leaves affected by downy mildew and environmental conditions. *Journal of Experimental Botany* 57(9): 2121-2132.

Osmond, C.B., 1994: What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. In: Baker, N.R und Bowyer, J.R. (Hrsg.): *Photoinhibition of Photosynthesis from molecular mechanisms to the field*. Bios Scientific Publishers, Oxford: 1-24.

Parry, D.W., Jenkinson, P., McLeod, L., 1995: *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals - A review. *Plant Pathology* 44(2): 207-238.

Peñuelas, J., Gamon, J.A., Fredeen, A.L., 1994: Reflectance indexes associated with physiological-changes in nitrogen-limited and water-limited sunflower leaves. *Remote Sensing of Environment* 48(2): 135-146.

Peñuelas, J., Baret, F., Filella, I., 1995: Semiempirical indexes to assess carotenoids chlorophyll-a ratio from leaf spectral reflectance. *Photosynthetica* 31(2): 221-230.

Peiris, K.H.S., Pumphrey, M.O., Dowell, F.E., 2009: NIR absorbance characteristics of deoxynivalenol and of sound and *Fusarium*-damaged wheat kernels. *Near Infrared Spectroscopy* 17: 213-221.

Perez-Bueno, M.L., Ciscato, M., vandeVen, M., Garcia-Luque, I., Valcke, R., Baron, M., 2006: Imaging viral infection: studies on *Nicotiana benthamiana* plants infected with the pepper mild mottle tobamovirus. *Photosynthesis Research* 90: 111-123.

Pestka, J.J., 2010: Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. *Archives of Toxicology* 84(9): 663-79.

Pestka, J.J., Smolinski, A.T., 2005: Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B - Critical Reviews* 8(1): 39-69.

Petkova, V., Denev, I.D., Cholakov, D., Porjazov, I., 2007: Field screening for heat tolerant common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) by measuring of chlorophyll fluorescence induction parameters. *Scientia Horticulturae* 111(2): 101-106.

Pflanzenschutzdienste der Länder Brandenburg, Sachsen und Thüringen, 2011: Hinweise zum sachkundigen Einsatz von Pflanzenschutzmitteln im Ackerbau und auf Grünland 2011. Landesamt für Verbraucherschutz, Landwirtschaft und Flurneuordnung, Frankfurt (Oder); Sächsisches Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie, Dresden; Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft, Erfurt-Kühnhausen (Hrsg.). <http://www.tll.de/ainfo/pdf/psab0210.pdf>. Verfügbar am: 11. Mai 2011.

Pineda, M., Soukupová, J., Matouš, K., Nedbal, L., Barón, M., 2008: Conventional and combinatorial chlorophyll fluorescence imaging of tobamovirus-infected plants. *Photosynthetica* 46: 441-451.

Pinter, P.J., Stanghellini, M.E., Reginato, R.J., Idso, S.B., Jenkins, A.D., Jackson, R.D., 1979: Remote detection of biological stresses in plants with infrared thermometry. *Science* 205: 585-587.

Pinto, L.S.R.C., Azevedo, J.L., Pereira, J.O., Vieira, M.L.C., Labate, C.A., 2000: Symptomless infection of banana and maize by endophytic fungi impairs photosynthetic efficiency. *New Phytologist* 147(3): 609-615.

Polder, G., van der Heijden, G.W.A.M., Young, I.T., 2002: Spectral image analysis for measuring ripeness of tomatoes. *Transactions of the ASAE* 45(4): 1155-1161.

Polder, G., van der Heijden, G.W.A.M., Waalwijk C., Young I.T., 2005: Detection of *Fusarium* in single wheat kernels using spectral imaging. *Seed Science and Technology* 33: 655-668.

Polder, G., van der Heijden, G.W.A.M., van Doorn J., van der Schoor, R., Baltissen, A.H.M.C., 2009: Detection of the tulip breaking virus (TBV) in tulip using spectral and vision sensors. In E. J. van Henten, D. Goense & C. Lokhorst (Hrsg.), *Precision Agriculture '09. Proceedings of the 7th European Conference on Precision Agriculture*, Wageningen, The Netherlands, 6-8 July. 2009. Wageningen, The Netherlands: Academic Publishers: 219-227.

Polder, G., van der Heijden, G.W.A.M., van Doorn, J., Clevers, J.G.P.W., van der Schoor, R., Baltissen, A.H.M.C., 2010: Detection of the tulip breaking virus (TBV) in tulips using optical sensors. *Precision Agriculture* 11: 397-412.

Polischuk, V.P., Shadchina, T.M., Kompanetz, T.I., Budzanivskaya, I.G., Boyko, A.L., Sozinov, A.A., 1997: Changes in reflectance spectrum characteristic of *Nicotiana debneyi* plant under the influence of viral infection. *Archiv Phytopathologie und Pflanzenschutz* 31: 115-119.

Pottberg, U., Pietsch, M., Heiermann, M., Plöchl, M., Büttner, C., Rodemann, B., 2010: Einfluss der anaeroben Vergärung in Laborbiogasanlagen auf die Inaktivierung von

pilzlichen Schadorganismen. 57. Deutsche Pflanzenschutztagung "Gesunde Pflanze - gesunder Mensch". Julius-Kühn-Archiv 428: S. 514.

Prokopová, J., Špundová, M., Sedlářová, M., Husíčková, A., Novotný, R., Doležal, K., Lebeda, A., 2010: Photosynthetic responses of lettuce to downy mildew infection and cytokinin treatment. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 716-723.

Quilitzsch, R., Hoberg, E., 2003: Fast determination of apple quality by spectroscopy in the near infrared. *Journal of Applied Botany* 77: 172-176.

Quilitzsch, R., Baranska, M., Schulz, H., Hoberg, E., 2005: Fast determination of carrot quality by spectroscopy methods in the UV-VIS, NIR and IR range. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 79: 163-167.

Ragab, W.S.M. Drusch, S. Kuhlmann, A. Beyer, M., 2005: Characterizing effects of fermentation and baking on the deoxynivalenol content of rolls. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 79: 197-201.

Rauppach, K., Marggraf, R., 2009: Diskussionspapiere April 2009. Verbraucherschutz vor dem Schimmelpilzgift Deoxynivalenol in Getreideprodukten. Aktuelle Situation und Verbesserungsmöglichkeiten: 40 S.

Reiser, M., Semmler, W. (Hrsg.), 1992: Magnetresonanztomographie. Springer-Verlag Berlin: 706 S.

Reusch, S., 1997: Entwicklung eines reflexionsoptischen Sensors zur Erfassung der Stickstoffversorgung landwirtschaftlicher Kulturpflanzen. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel: 157 S.

Richards, J.A., Jia, X., 1999: Supervised classification techniques. In: *Remote Sensing Digital Image Analysis*. Springer-Verlag GmbH, Heidelberg: 193-247.

Risius, H., Hahn, J., Korte, H., 2008: Die Guten ins Töpfchen - Trennung des Erntegutes nach Qualitätseigenschaften während des Mähdruschs, *Neue Landwirtschaft* 11: 52-54.

Risius, H., Hahn, J., Korte, H., 2009: Implementation of process analytical technology (PAT) for the determination of product quality on a combine harvester. In: 67. International Conference on agricultural engineering LAND. TECHNIK Ag Eng, 6.-7.11.2009. Hannover, Germany: 375-380.

Robert, C., Bancal, M.O., Lannou, C., Ney, B., 2006: Quantification of the effects of *Septoria tritici* blotch on wheat leaf gas exchange with respect to lesion age, leaf number, and leaf nitrogen status. *Journal of Experimental Botany* 57(1): 225-234.

Rolfe, S.A., Scholes, J.D., 2010: Chlorophyll fluorescence imaging of plant-pathogen interactions. *Protoplasma* 247: 163-175.

Rouse, J.W., Haas, R.H., Deering, D.W., Schell J.A., Harlan, J.C., 1974: Monitoring the vernal advancement and retrogradation (green wave effect) of natural vegetation. NASA/GSFC Type III. Final Report, Greenbelt, Maryland, 371 S.

Ruiz-Altisent, M., Ruiz-Garcia, L., Moreda, G.P., Lu, R., Hernández-Sánchez, N., Correa, E.C., Diezma, B., Nicolai, B., García-Ramos, J., 2010: Sensors for product characterization and quality of specialty crops - A review. *Computers and Electronics in Agriculture* 74(2): 176-194.

Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C., Filtenborg, O., 1995: Introduction to food-borne fungi. Centralbureau voor schimmelcultures (CBS), Baarn Delft, Netherlands: 322 S.

Schlüter, K. Kropf, U., Karlovsky, P., 2006: Untersuchungen zur systemischen Infektion von *Fusarium culmorum* an Winterweizen in Schleswig-Holstein. *Gesunde Pflanzen* 2: 107-116.

Schlüter, O., Zeymer, J., Förster, J., Brandenburg, R., Ehlbeck, J., Herppich, W. B., Geyer, M., Knorr, D., 2008a: Comprehensive evaluation of the non-destructive application of innovative physical treatments for preservation of fresh produce. 4th International Symposium on Machinery and Mechatronics for Agricultural and Biosystems Engineering, Tagungs-CD; FE19-FE24.

Schlüter, O., Foerster, J., Herppich, W.B., Geyer, M., Knorr, D., 2008b: Non-destructive evaluation of high-pressure processing effects on fresh produce. Book of Abstracts, 1st Symposium on Horticulture in Europe, Wien, Österreich, 17.-20.02.2008: 184.

Schmitz, A., 2004: Eignung berührungsloser Messverfahren zur Erkennung des Befalls von Zuckerrüben durch *Heterodera schachtii* (Schmidt) und Möglichkeiten der teilflächenspezifischen integrierten Bekämpfung. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn: 114 S.

Scholes, J.D., Rolfe, S.A., 1996: Photosynthesis in localised regions of oat leaves infected with crown rust (*Puccinia coronata*): quantitative imaging of chlorophyll fluorescence. *Planta* 199: 573-582.

Schreiber, U., Schliwa, U., Bilger, W., 1986: Continuous recording of photochemical and nonphotochemical quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis Research* 10: 51-62.

Schreiber, U., 2004: Pulse-amplitude-modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: an overview. In: Papageorgiou, G. C., Govindjee, X. (Hrsg.): *Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis*. Springer, Netherlands: 279-319.

Schulz, H., Baranska, M., 2007: Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy* 43(1): 13-25.

Scotford, I.M., Miller, P.C.H., 2005: Applications of spectral reflectance techniques in northern European cereal production: a review. *Biosystems Engineering* 90(3): 235-250.

Seigner, L., Friedrich, R., Kaemmerer, D., Büttner, P., Poschenrieder, G., Hermann, A., Gronauer, A., 2010: Hygienisierungspotenzial des Biogasprozesses. Ergebnisse aus einem Forschungsprojekt. Schriftenreihe der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft 8: 34 S.

Shaner, G.E., 2005: Epidemiology of *Fusarium* head blight of small grain cereals in North America. In: Leonard, K.J., Bushnell, W.R. (Hrsg.), *Fusarium* head blight of wheat and barley. The American Phytopathological Society. APS Press. St. Paul, Minnesota: 84-119.

Shahin, M.A., Symons, S.J., 2011: Detection of *Fusarium* damaged kernels in Canada Western red spring wheat using visible/near-infrared hyperspectral imaging and principal component analysis. *Computers and Electronics in Agriculture* 75(1): 107-112.

Singh, C.B., Jayas, D.S., Paliwal, J., White, N.D.G., 2007: Fungal detection in wheat using near-infrared hyperspectral imaging. *Transactions of ASABE* 50(6): 2171-2176.

Smith, R.C.G., Heritage, A.D., Stapper, M., Barss, H.D., 1986: Effect of stripe rust (*Puccinia striiformis* West.) and irrigation on the yield and foliage temperature of wheat. *Field Crops Research* 14: 39-51.

Sökefeld, M., Gerhards, R., Therburg, R.-D., Nabout, A., Jacobi, J., Lock, R., Kühbauch, W., 2002: Multispektrale Bildanalyse zu Erfassung von Unkraut und Blattkrankheiten. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. Sonderheft XVIII*: 437-442.

Solovchenko, A.E., Chivkunova, O.B., Merzlyak, M.N., Gudkovsky, V.A., 2005: Relationships between chlorophyll and carotenoid pigments during on- and off-tree ripening of apple fruit as revealed non-destructively with reflectance spectroscopy. *Postharvest Biology and Technology* 38: 9-17.

Sommer, C., Zühlke, S., Steiner, U., Oerke, E.-C., Dehne, H.-W., 2010: Heterogenität des Auftretens von *Fusarium* spp. und assoziierter Mykotoxine an Weizenähren. 57. Deutsche Pflanzenschutztagung "Gesunde Pflanze - gesunder Mensch". Julius-Kühn-Archiv 428, S. 69.

South, S., Qi, J., Lusch, D.P., 2004: Optimal classification methods for mapping agricultural tillage practices. *Remote Sensing of Environment* 91: 90-97.

Stenzel, I., Steiner, U., Dehne, H.W., Oerke, E.C., 2007: Occurrence of fungal leaf pathogens in sugar beet fields monitored with digital infrared thermography. Conference Information: Precision agriculture '07. Papers presented at the 6th European Conference on Precision Agriculture, Skiathos, Greece, 3-6 June, 2007, 529-535.

Stober, F., Lang, M., Lichtenthaler, H.K., 1994: Blue, green, and red fluorescence emission signatures of green, etiolated, and white leaves. *Remote Sensing of Environment* 47: 65-71.

Stoll, M., Schultz, H.R., Baecker, G., Berkelmann-Loehnertz, B., 2008: Early pathogen detection under different water status and the assessment of spray application in vineyards through the use of thermal imagery. *Precision Agriculture* 9(6): 407-417.

Suida, R., Balcerowska, G., Sadowski, C., 2006: Comparison of the usability of different spectral ranges within the near ultraviolet, visible and near infrared ranges (UV-VIS-NIR) region for the determination of the content of scab-damaged component in blended samples of ground wheat. *Food Additives and Contaminants* 23(11): 1201-1207.

Tartachnyk, I., Rademacher, I., 2003: Estimation of nitrogen deficiency of sugar beet and wheat using parameters of laser induced and pulse amplitude modulated chlorophyll fluorescence. *Journal of Applied Botany* 77: 61-67.

Tartachnyk I., Rademacher, I., Kuehbauch, W., 2006: Distinguishing nitrogen deficiency and fungal infection of winter wheat by laser-induced fluorescence. *Precision Agriculture* 7(4): 281-293.

Thate, A., Schumann, S., Hanschmann, G., Urban, Y., 2008: Auftreten von Ährenfusariosen und Mykotoxinen in Sachsen und Ergebnisse der Vor- und Nachernteuntersuchungen von Winterweizen 2007. *Nachrichtenblatt Deutscher Pflanzenschutzdienst* 60: S. 117.

Thiessen, E., 2002: Optische Sensortechnik für den teilflächenspezifischen Einsatz von Agrochemikalien. Dissertation Christian-Albrechts-Universität zu Kiel: 96 S.

Tu, J.C., Tan, C.S., 1985: Infrared thermometry for determination of root rot severity on bean. *Phytopathology* 75: 840-844.

von Willert, D.J., Matyssek, R., Herppich, W. B., 1995: Experimentelle Pflanzenökologie, Grundlagen und Anwendungen. Georg Thieme Verlag Stuttgart: 344 S.

Walther, U., Flath, K., Moll, E., Prochno, J., Sachs, E., 2000: Methodische Anleitung zur Bewertung der partiellen Resistenz von Sorten bzw. Linien unter Berücksichtigung epidemiologischer Aspekte. *Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft* 374: 9-25.

Wang, X., Cai, J., Jiang, D., Lui, F., Dai, T., Cao, W., 2011: Pre-anthesis high-temperature acclimation alleviates damage to the flag leaf caused by post-anthesis heat stress in wheat. *Journal of plant Physiology* 168(6): 585-598.

Weiß, D., 2011: Fluoreszenz. <http://www.chemie.uni-jena.de/institute/oc/weiss/fluoreszenz.htm>. Verfügbar am: 1. Juni 2011.

West, J.S., Bravo, C., Oberti, R., Lemaire, D., Moshou, D., McCartney, H.A., 2003: The potential of optical canopy measurement for targeted control of field crop diseases. *Annual Review of Phytopathology* 41: 593-614.

Williams, P., Manley, M., Fox, G., Geladi, P., 2010: Indirect detection of *Fusarium verticillioides* in maize (*Zea mays* L.) kernels by near infrared hyperspectral imaging. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 18: 49-58.

Wiwart, M., Koczowska, I., Borusiewicz, A., 2001: Estimation of *Fusarium* head blight of Triticale using digital image analysis of grain. In: Skarbek, W. (Hrsg.): *Computer analysis of images and patterns* 2124. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg: 563-569.

Yang, C., Everitt, J.H., 2010: Comparison of hyperspectral imagery with aerial photography and multispectral imagery for mapping broom snakeweed. *International Journal of Remote Sensing* 31(20): 5423-5438.

Yuhas, R.H., Goetz, F.H.A., Boardmann, J.W., 1992: Discrimination among semiarid landscape endmembers using the Spectral Angle Mapper (SAM) algorithm. In: Summaries of the Third Annual JPL Airborne Geoscience Workshop, Jet Propulsion Laboratory Publication 92. Pasadena, CA: 147-149.

Zarco-Tejada, P.J., Ustin, S.L., Whiting, M.L., 2005: Temporal and spatial relationships between within-field yield variability in cotton and high-spatial hyperspectral remote sensing imagery. *Agronomy Journal* 97: 641-653.

Anhang

Allgemeine Bemerkung: Die Identitätsnummer (ID) setzt sich aus der Variante (UK=unbehandelte Kontrolle; I=infizierte Pflanze) und einer durchgehenden Nummerierung von markiertem Topf und Pflanze zusammen.

P1: Protokoll, das für alle CFA-Labormessungen genutzt wurde:

;protocol body - generated by wizard

;version DL October 31, 2000

include default.inc ;Includes standard options, do not remove it !

ElectronicShutter=1

Sensitivity=50

Irradiance=50

SuperIrradiance=100

<0,40ms*25..3s>=>fm

<0>=>avgstart

<3s>=>m,avgstop

<1s>=>checkPoint,"min_fl_dark"

<3s+80ms,3s+80ms+20ms..3s+80ms+1s+1600ms>=>F

<3s+80ms,3s+80ms+20ms..3s+80ms+1600ms>=>Sh

<3s+80ms>=>actinlightOn(1600ms+20ms)

<3s+80ms+80ms,3s+80ms+80ms+40ms..3s+80ms+1600ms>=>fm

<3s+160ms>=>avgstart

<3s+1600ms+80ms>=>m,avgstop

<3.96s>=>checkPoint,"max_fl_dark"

P2: Protokoll, das am 24.06.09 zu den CFA-Messungen genutzt wurde:

;protocol body - generated by wizard

;version DL October 31, 2000

include default.inc ;Includes standard options, do not remove it !

ElectronicShutter=1

Sensitivity=60

Irradiance=90

SuperIrradiance=100

<0,40ms*5..1s>=>fm

<0>=>avgstart

<1s>=>m,avgstop

<1s>=>checkPoint,"min_fl_dark"

<1s+80ms,1s+80ms+20ms..1s+80ms+1s+1000ms>=>F

<1s+80ms,1s+80ms+20ms..1s+80ms+1000ms>=>Sh

<1s+80ms>=>actinlightOn(1000ms+20ms)

<1s+80ms+80ms,1s+80ms+80ms+40ms..1s+80ms+1600ms>=>fm

<1s+400ms>=>avgstart

<1s+1000ms+80ms>=>m,avgstop

<1.96s>=>checkPoint,"max_fl_dark"

Tab. A2: Bonitierte Befallsgrade in % (zusätzlicher Versuch)

ID	20.03.2008	23.03.2008	25.03.2008	08.04.2008
5_3	90	100	100	100
5_5	50	60	60	100
5_7	40	40	40	100
5_9	40	50	100	100
5_10	2	0	20	k.A.
5_15	10	10	15	90
6_3	100	100	100	100
6_6	20	20	70	100
6_7	50	100	100	100
7_4	0	0	0	100
7_5	3	3	2	5
7_7	2	5	5	85
8_4	60	80	100	100
8_8	10	10	20	100
8_11	50	50	90	100
8_13	40	90	100	100

Tab. A4: Bonitierte Schädigung in % (Versuch2)

ID	Ges 210308	Ges 230308	Ges 260308	Ges 280308	Ges 310308	Ges 020408	Ges 040408	Ges 080408	Ges 090408	Ges 110408	Ges 290408
I1_1	2	1	3	7	8	13	13	80	100	100	100
I1_10	1	2	3	4	12	12	22	30	40	40	100
I1_9	1	3	4	4	6	12	20	30	100	100	100
I2_11	1	3	4	5	8	23	23	90	90	100	100
I2_12	3	5	10	10	5	13	23	90	90	100	
I2_14	1	2	6	7	22	13	13	40	70	100	
UK1_1	0	0	0	0	1	40	70	100	100	100	100
UK1_3	0	0	1	2	20	20	20	50	60	80	100
UK1_4	0	0	0	0	40	60	80	100	100	100	100
UK2_1	1	2	1	1	2						
UK2_2	3	3	3	2	4						
UK2_5	2	1	2	1	1						
UK3_12	0	0	1	2	5	5	5	10	20	20	
UK3_4	3	3	1	1	1	5	5	5	20	40	100
UK3_6	3	3	2	1	2	5	3	2	20	40	100
UK3_7	1	1	0	1	2	2	7	2	50	70	100
UK3_8	0	0	2	1	10	5	5	5	20	60	100
UK3_9	0	0	0	1	5	10	5	20	20	20	100
UK4_1	0	0	0	0	2	2	0	0	60	60	100
UK4_12	1	2	1	1	2	5	7	6	40	50	100
UK4_13	3	3	3	4	4	50	50	52	50	70	100
UK4_14	2	3	2	2	4	3	10	2	52	60	100
UK4_2	0	0	1	2	5	2	0	0	40	50	100
UK4_4	1	1	1	1	3	2	2	2	60	60	100
UK4_5	2	2	0	1	2	2	3	1	40	40	100
UK4_8	1	1	2	5	10	20	20	20	50	50	100
UK4_9	3	3	1	2	4	30	32	32	70	100	100

Tab. A7: Befallsbonitur der Freilandpflanzen für die hyperspektralen Messungen (09.07.08)

Einzelähren für hyperspektrale Messungen

(Freilandversuch JKI Braunschweig, Pflanzen ausgegraben, transportiert, gemessen)				
Sorte	Wdh	Topfbez.	Ährennr.	%Befall/Ähre
2	1	2_1	1	25
2	1	2_1	2	5
2	1	2_1	3	40
2	1	2_1	4	0
2	1	2_1	5	0
2	1	2_1	6	0
2	2	2_2	1	40
2	2	2_2	2	50
2	2	2_2	3	0
2	2	2_2	4	50
2	2	2_2	5	5
2	2	2_2	6	5
1	2	1_2	1	70
1	2	1_2	2	0
1	2	1_2	3	20
1	2	1_2	4	0
1	2	1_2	5	0
1	1	1_1	1	0
1	1	1_1	2	20
1	1	1_1	3	2
1	1	1_1	4	0
1	1	1_1	5	3

Tab. A8: Bonitierte Befallsgrade in % und BBCH-Stadien (Versuch 3)

Datum	ID	BBCH	Fusarium	taube_Aehren
08.09.2008	UK1_1	69	0	0
08.09.2008	UK1_4	69	0	0
08.09.2008	UK1_5	69	0	0
08.09.2008	UK1_6	71	0	0
08.09.2008	UK1_7	65	0	0
08.09.2008	UK1_10	71	0	0
08.09.2008	UK2_1	71	0	0
08.09.2008	UK2_2	71	0	0
08.09.2008	UK2_4	71	0	0
08.09.2008	UK2_5	71	0	0
08.09.2008	UK2_6	71	0	0
08.09.2008	UK2_9	71	0	0
08.09.2008	I1_1	71	0	0
08.09.2008	I1_2	71	0	0
08.09.2008	I1_3	71	0	0
08.09.2008	I1_4	71	0	0
08.09.2008	I1_5	71	0	0
08.09.2008	I1_6	65	0	0
08.09.2008	I2_1	71	0	0
08.09.2008	I2_3	71	0	0
08.09.2008	I2_4	71	0	0
08.09.2008	I2_5	71	0	0
08.09.2008	I2_6	65	0	0
08.09.2008	I2_7	71	0	0
12.09.2008	UK1_1	71/73	0	0
12.09.2008	UK1_4	71/73	0	0
12.09.2008	UK1_5	71	0	0
12.09.2008	UK1_6	71/73	0	0
12.09.2008	UK1_7	71	0	0
12.09.2008	UK1_10	71	0	0
12.09.2008	UK2_1	73	0	0
12.09.2008	UK2_2	71/73	0	0
12.09.2008	UK2_4	71	0	0
12.09.2008	UK2_5	71/73	0	0
12.09.2008	UK2_6	71/73	0	0
12.09.2008	UK2_9	71	0	0
12.09.2008	I1_2	73	0	0
12.09.2008	I1_3	71/73	5	0
12.09.2008	I1_4	71	0	0
12.09.2008	I1_5	73	0	0
12.09.2008	I1_6	71	1	0
12.09.2008	I2_1	73	1	0
12.09.2008	I2_3	71/73	1	0
12.09.2008	I2_4	71	1	0
12.09.2008	I2_5	71/73	2	0
12.09.2008	I2_6	71	0	0
12.09.2008	I2_7	71/73	2	0
15.09.2008	UK1_1	73	0	0
15.09.2008	UK1_4	73	0	0
15.09.2008	UK1_5	73	0	0
15.09.2008	UK1_6	73	0	0
15.09.2008	UK1_7	73	0	0
15.09.2008	UK1_10	73	0	0
15.09.2008	UK2_1	73	0	0
15.09.2008	UK2_2	73	0	1
15.09.2008	UK2_4	73	0	1
15.09.2008	UK2_5	73	0	0
15.09.2008	UK2_6	73	0	0
15.09.2008	UK2_9	73	0	0
15.09.2008	I1_1	73	5	0
15.09.2008	I1_2	73	3	0
15.09.2008	I1_3	73	20	0
15.09.2008	I1_4	73	5	0
15.09.2008	I1_5	73	0	0
15.09.2008	I1_6	73	3	0
15.09.2008	I2_1	73	5	0
15.09.2008	I2_3	73	5	0
15.09.2008	I2_4	73	3	0
15.09.2008	I2_5	73	10	0
15.09.2008	I2_6	73	0	0
15.09.2008	I2_7	73	10	0

Datum	ID	BBCH	Fusarium	taube_Aehrchen
17.09.2008	UK1_1	73	0	0
17.09.2008	UK1_4	73	0	0
17.09.2008	UK1_5	73	0	0
17.09.2008	UK1_6	73	0	0
17.09.2008	UK1_7	73	0	0
17.09.2008	UK1_10	73	0	0
17.09.2008	UK2_1	73	0	0
17.09.2008	UK2_2	73	0	1
17.09.2008	UK2_4	73	0	1
17.09.2008	UK2_5	73	0	0
17.09.2008	UK2_6	73	0	0
17.09.2008	UK2_9	73	0	0
17.09.2008	I1_1	73	5	0
17.09.2008	I1_2	73	3	0
17.09.2008	I1_3	73/75	30	0
17.09.2008	I1_4	73	5	0
17.09.2008	I1_5	73	0	0
17.09.2008	I1_6	73	3	0
17.09.2008	I2_1	73	5	0
17.09.2008	I2_3	73	3	0
17.09.2008	I2_4	73	5	0
17.09.2008	I2_5	75	20	0
17.09.2008	I2_6	73	0	0
17.09.2008	I2_7	73	15	0
19.09.2008	UK1_1	75	0	0
19.09.2008	UK1_4	75	0	0
19.09.2008	UK1_5	75	0	0
19.09.2008	UK1_6	75	0	0
19.09.2008	UK1_7	75	0	0
19.09.2008	UK1_10	75	0	0
19.09.2008	UK2_1	75	0	0
19.09.2008	UK2_2	75	0	1
19.09.2008	UK2_4	75	0	1
19.09.2008	UK2_5	75	0	1
19.09.2008	UK2_6	75	0	0
19.09.2008	UK2_9	75	0	0
19.09.2008	I1_1	75	5	0
19.09.2008	I1_2	75	3	0
19.09.2008	I1_3	75	30	0
19.09.2008	I1_4	75	10	0
19.09.2008	I1_5	75	2	0
19.09.2008	I1_6	75	5	0
19.09.2008	I2_1	75	5	0
19.09.2008	I2_3	75	3	0
19.09.2008	I2_4	75	5	0
19.09.2008	I2_5	75	20	0
19.09.2008	I2_6	75	2	0
19.09.2008	I2_7	75	20	0
22.09.2008	UK1_1	79	0	1
22.09.2008	UK1_4	79	0	0
22.09.2008	UK1_5	79	0	0
22.09.2008	UK1_6	79	0	1
22.09.2008	UK1_7	79	0	0
22.09.2008	UK1_10	79	0	0
22.09.2008	UK2_1	79	0	1
22.09.2008	UK2_2	79	0	0
22.09.2008	UK2_4	79	0	2
22.09.2008	UK2_5	79	0	1
22.09.2008	UK2_6	79	0	0
22.09.2008	UK2_9	79	0	1
22.09.2008	I1_1	79	5	0
22.09.2008	I1_2	79	10	0
22.09.2008	I1_3	79	40	0
22.09.2008	I1_4	79	10	0
22.09.2008	I1_5	79	5	0
22.09.2008	I1_6	79	10	0
22.09.2008	I2_1	79	10	0
22.09.2008	I2_3	79	5	0
22.09.2008	I2_4	79	5	0
22.09.2008	I2_5	79	25	0
22.09.2008	I2_6	79	2	0
22.09.2008	I2_7	79	20	0

Datum	ID	BBCH	Fusarium	taube_Aehrchen
30.09.2008	UK1_1	85	0	1
30.09.2008	UK1_4	85	0	1
30.09.2008	UK1_5	85	95	0
30.09.2008	UK1_6	85	0	5
30.09.2008	UK1_7	85	0	0
30.09.2008	UK1_10	85	0	1
30.09.2008	UK2_1	85	0	5
30.09.2008	UK2_2	85	0	5
30.09.2008	UK2_4	85	0	5
30.09.2008	UK2_5	85	0	2
30.09.2008	UK2_6	85	0	5
30.09.2008	UK2_9	85	0	5
30.09.2008	I1_1	85	10	0
30.09.2008	I1_2	85	40	0
30.09.2008	I1_3	85	40	0
30.09.2008	I1_4	85	50	0
30.09.2008	I1_5	85	95	0
30.09.2008	I1_6	85	15	0
30.09.2008	I2_1	85	80	0
30.09.2008	I2_3	85	20	0
30.09.2008	I2_4	85	25	0
30.09.2008	I2_5	85	30	0
30.09.2008	I2_6	85	30	0
30.09.2008	I2_7	85	50	0

Tab. A9: Klassifizierungsergebnisse bei Anwendung des HBI und des SAM sowie bonitierter Befall in %

Datum	Variante	HBI	SAM	bon. Befall in % (MW n=6)
09.09.2008	I1	0,56	3,84	0,00
12.09.2008	I1	1,08	5,08	1,17
15.09.2008	I1	1,23	8,36	6,00
17.09.2008	I1	1,56	11,18	7,67
19.09.2008	I1	4,08	15,00	10,75
22.09.2008	I1	3,78	21,63	13,33
30.09.2008	I1	21,38	36,52	41,67
04.11.2008	I1	88,22	100,00	100,00
09.09.2008	I2	0,46	4,50	0,00
12.09.2008	I2	0,92	6,10	1,17
15.09.2008	I2	1,40	8,75	5,50
17.09.2008	I2	1,38	11,00	8,00
19.09.2008	I2	2,33	13,51	9,17
22.09.2008	I2	4,61	23,90	11,17
30.09.2008	I2	21,83	38,86	39,17
04.11.2008	I2	94,18	100,00	100,00
09.09.2008	UK1	0,43	5,14	0,00
12.09.2008	UK1	10,53	4,55	0,00
15.09.2008	UK1	3,55	3,18	0,00
17.09.2008	UK1	0,33	4,06	0,00
19.09.2008	UK1	0,43	4,67	0,00
22.09.2008	UK1	2,53	8,19	0,33
30.09.2008	UK1	8,07	20,75	17,17
04.11.2008	UK1	96,10	100,00	100,00
09.09.2008	UK2	0,82	5,94	0,00
12.09.2008	UK2	0,92	5,38	0,00
15.09.2008	UK2	0,78	5,40	0,33
17.09.2008	UK2	0,81	6,66	0,33
19.09.2008	UK2	1,46	7,75	0,50
22.09.2008	UK2	2,84	11,65	0,83
30.09.2008	UK2	8,74	17,42	4,50
04.11.2008	UK2	92,81	100,00	100,00

Tab. A10: Durchgeführte Versuche und Datengrundlage

Zeitreihenversuche				
V1 (Ziel: Zeitfenster, Genauigkeit): nicht auswertbar, keine Symptome, keine Infektion Jan/Feb 2008	Bonitur (BBCH, Befallsgrad in %) digitale Fotodokumentation	CFA $n_{UK} = 6$ $n_i = 6$ Parameter: F_0, F_m	HSA $n_{UK} = 6$ $n_i = 6$ Parameter: Spektrum 400- 1000 nm	am Versuchsende Parameter: Keimbestimmung Bestimmung des DON-Gehaltes
V 2 (Ziel: Zeitfenster, Genauigkeit) 20.03.2008- 29.04.2008	Bonitur (BBCH, Befallsgrad in %) digitale Fotodokumentation	CFA $n_{UK} = 6$ $n_i = 6$ 14 Messtermine Parameter: F_0, F_m	HSA $n_{UK} = 6$ $n_i = 6$ 14 Messtermine (Klassifizierungs- bilder) Parameter: Spektrum 400- 1000 nm Klassifizierung mittels SAM/HBI	am Versuchsende Parameter: Ährchen/Ähre Länge der Ähre Gewicht der Ähre Gewicht Körner/Ähre Keimbestimmung Bestimmung des DON-Gehaltes
V 3 (Ziel: Zeitfenster, Genauigkeit) 08.09.2008- 04.11.2008	Bonitur (BBCH, Befallsgrad in %) digitale Fotodokumentation	CFA $n_{UK} = 2$ mit je 5 Wdh. (Einfluss Morphologie – Breit- oder Schmalseite der Ähre, Einfluss Verdunklungs- zeit) 2 Messtermine Parameter:	HSA $n_{UK} = 12$ $n_i = 12$ 8 Messtermine (Trainingsdaten- satz- und Klassifizierungs- bilder getrennt) Parameter:	am Versuchsende Parameter: Ährchen/Ähre Länge der Ähre Gewicht der Ähre Gewicht Körner/Ähre Keimbestimmung

		F_0, F_m	Spektrum 400-1000 nm Klassifizierung mittels SAM/HBI	Bestimmung des DON-Gehaltes
Zusätzliche Versuche (ausgeprägte Symptome) - Laborpflanzen				
(Ziel: Datengrundlage für Wellenlängenfindung erweitern, ROIs) 21.03.2008-07.04.2008	Bonitur (BBCH, Befallsgrad in %) digitale Fotodokumentation	CFA $n_i = 15$ 4 Messtermine Parameter: F_0, F_m	HSA $n_i = 15$ 4 Messtermine (Trainingsdatensatz) Parameter: Spektrum 400-1000 nm	am Versuchsende Parameter: Ährchen/Ähre Länge der Ähre Gewicht der Ähre Gewicht Körner/Ähre Keimbestimmung Bestimmung des DON-Gehaltes
Zusätzliche Versuche (ausgeprägte Symptome) - Feldpflanzen				
(Ziel: Datengrundlage für Wellenlängenfindung erweitern) 09.07.2008	Bonitur (BBCH, Befallsgrad in %) digitale Fotodokumentation		HSA $n_{\text{anfällige Sorte}} = 12$ $n_{\text{resistente Sorte}} = 9$ 1 Messtermin Parameter: Spektrum 400-1000 nm	
Feldversuch				
(Ziel: Applikation der CFA im Freiland – Genauigkeit der Methode) 23.06.-24.06.2009	Bonitur (BBCH, Befallsgrad in %) digitale Fotodokumentation	CFA $n_i = 50$ 2 Messtermine		

		Parameter: F_0, F_m Ausreißer- eliminierung: Entfernung max. 30 cm, optimale Ausleuchtung - verbliebene Datengrundlage: 30 Ähren		
Trainingsbilder (spektrale Aufnahmen)				
spektrale Bibliothek für Wellenlängen- findung	zur Findung distinkter Wellenlängenbereiche: ca. 100 Spektren (zusätzliche Versuche Labor- und Feldpflanzen)			
spektrale Bibliothek für Wellenlängen- findung	Zeitliche Spektrendifferenzierung: V3 292 Spektren Infizierte: ca. 20-40 Spektren pro Termin (11 Ähre 1 bis 4), 8 Messtermine UK: 80 Spektren aus 8 Messterminen			
Setzung der ROIs	zusätzlicher Versuch: endmember aus $n_{UK}=5$; $n_i=5$ (Ährenanzahl) V3: endmember aus $n_{UK}=10$; $n_i=8$ (Ährenanzahl), Termin 19.09.2008 für die ROIs wurden mehrere Areale aus einer Ähre ausgewählt			

Abb. A1: Beispiel der SAM-Klassifizierung drei infizierter Ähren am 21. dai (links: Spektralbild RGB 450 nm, 550 nm, 650 nm, rechts: Klassifizierung [verschiedene Farben zeigen einzelne ROI-Anteile bei der Klassifizierung an])

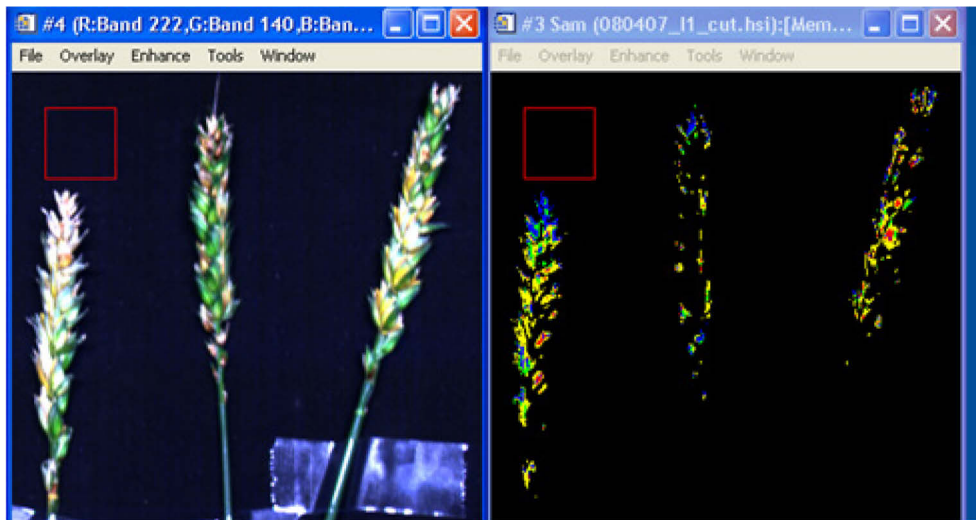


Abb. A2: Beispiel von Missklassifikationen gesunder Ähren im BBCH 89 bei Anwendung von SAM (obere Reihe: links Spektralbild [RGB 450 nm, 550 nm, 650 nm] und rechts Klassifizierungsbild [rote Bereiche = krank])



Abb. A3: Anhaftende Antheren als Beispiel von Missklassifikationen gesunder Ähren im BBCH 71 bei Anwendung von SAM (obere Reihe: links Spektralbild [RGB 450 nm, 550 nm, 650 nm] und rechts Klassifizierungsbild [rote Bereiche = krank, grüne Bereiche = gesund])

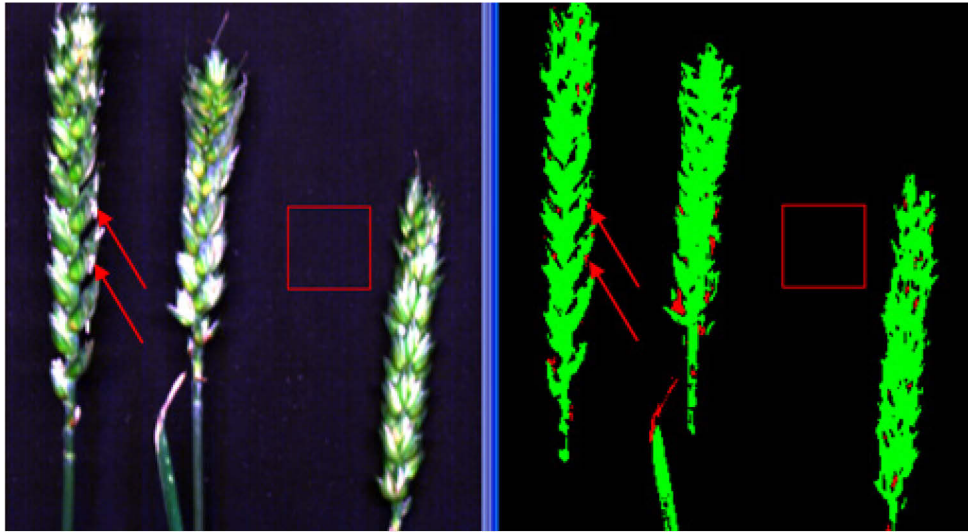
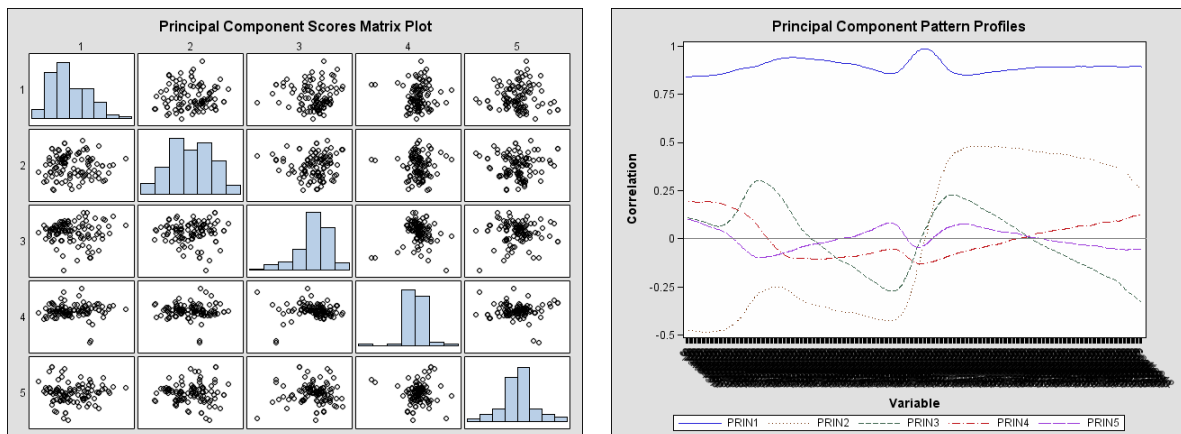
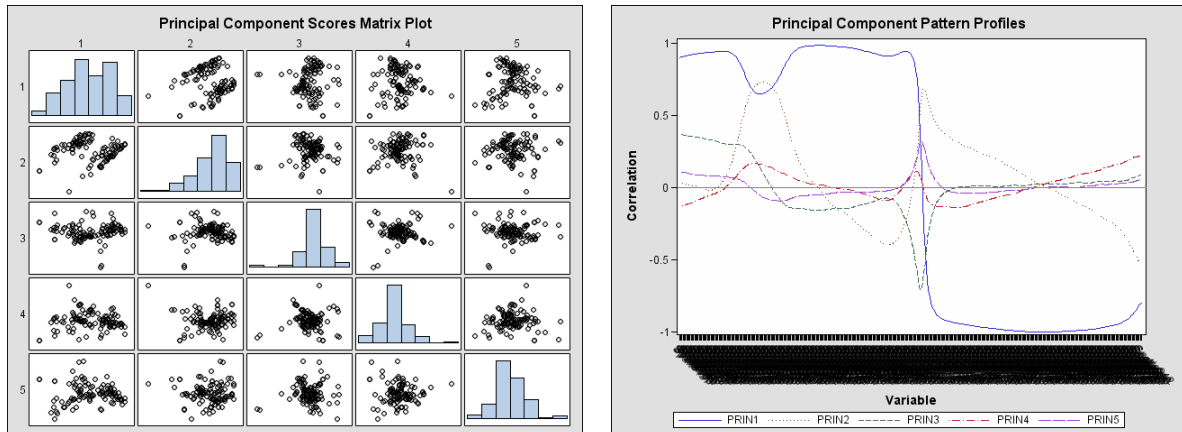


Abb. A4: Anwendung der PCA in den einzelnen Stadien der Spektrenaufbereitung

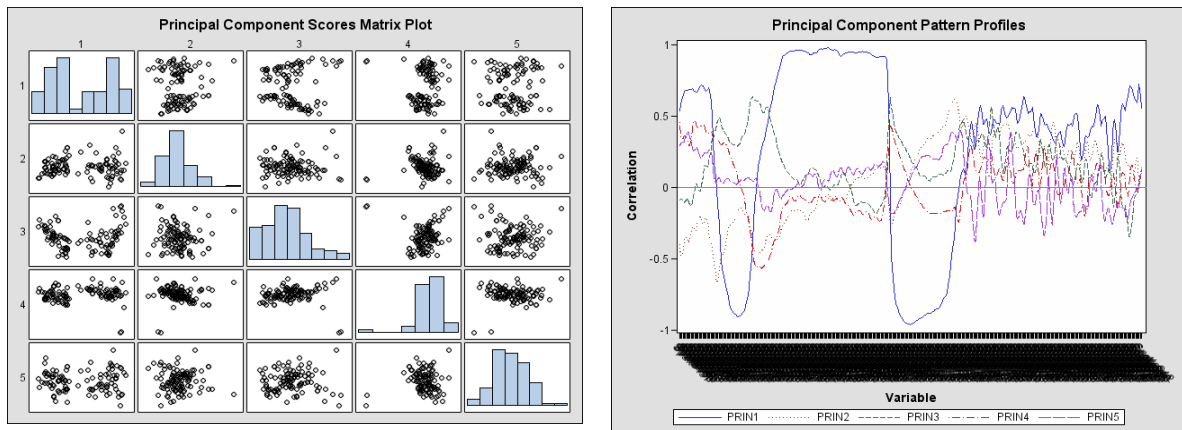
a) Verrechnung mit nicht standardisiertem Spektrum (nur Glättung)



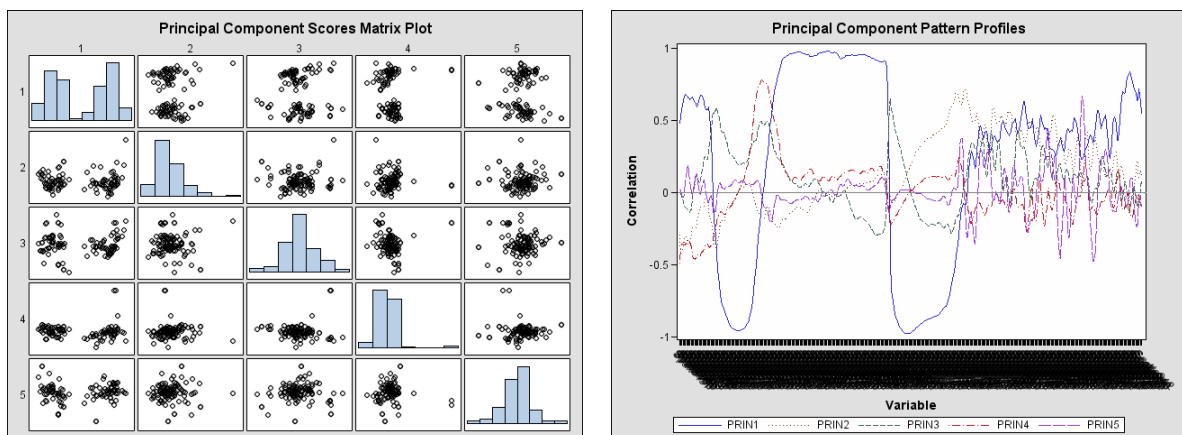
b) Verrechnung mit geglättetem, standardisiertem Spektrum (sum-Funktion)



c) Verrechnung mit nicht standardisiertem Spektrum (nur Glättung) und gebildeter 1. Ableitung



d) Verrechnung mit geglättetem, standardisiertem Spektrum (sum-Funktion), 1. Ableitung



Daten aus Tab. A1, A3, A5 und A6 sind bei der Autorin einsehbar.

Tab. A1: F_v/F_m -Werte und bonitierte Befallsgrade der Freilandmessungen im Juni 2009

Tab. A3: Kumulative F_v/F_m -Werte (zusätzlicher Versuch)

Tab. A5: Kumulative F_v/F_m -Werte der Kontrollpflanzen (n=6) des Versuches 2

Tab. A6: Kumulative F_v/F_m -Werte der infizierten Pflanzen (Versuch2)

Danksagung

Die Untersuchungen fanden im Rahmen des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderten ProSensoNet²-Projektes statt mit dem Titel „Erschließung von Nachhaltigkeitspotenzialen durch Nutzung innovativer Sensortechnologien und ganzheitlicher Bewertungsmodelle in der Produktionskette von pflanzlichen Lebensmitteln“. Die Einwerbung des Teilprojektes „Sensorgestützte Detektion von Mykotoxinbildnern im Getreidebau“ gelang Dr. Dammer und die Besetzung der Doktorandenstelle mit meiner Person, für die ich an dieser Stelle danke, legte den Grundstock für diese Promotion.

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Betreuer, Herrn Dr. Werner B. Herppich bedanken, der mir immer „half ohne vorzusagen“ und dessen hilfsbereite unterstützende und verständnisvolle Art es mir ermöglichte, die kumulative Promotion doch in Angriff zu nehmen. Nicht zuletzt teilte er alle Höhen und Tiefen bei den Veröffentlichungen (die wunderbaren als auch niederschmetternden reviews) und bei der Fertigstellung der Arbeit.

Ein großes Dankeschön gilt Herrn Prof. Uwe Schmidt von der Humboldt-Universität zu Berlin, der sich des Themas annahm und mitdiskutierte, wie weitere technische Lösungsansätze gefunden werden müssen.

Auch bei Herrn Dr. Martin Geyer möchte ich mich herzlich bedanken für seine Unterstützung, sei es bei der Vermittlung persönlicher Kontakte, der Weiterfinanzierung und Diskussionen um weitere Projektvorhaben oder der Begutachtung der Arbeit.

Beträchtlichen Anteil zum Gelingen dieser Arbeit hat auch Antje Giebel, die mir bei den Labor- und Feldmessungen, den Auswertungen und in Diskussionen half, unseren *Fusarium*-Pilz richtig zu inspizieren. Herr Dr. Horst Beuche und Herr Joachim Intreß bauten die hyperspektrale Messapparatur auf, die mit diesen Untersuchungen eingeweiht, erprobt und verbessert wurde. Viele Kollegen der Abteilung „Technik im Pflanzenbau“ unterstützten mich in praktischen Dingen wie Bau des Freilandmessgerüsts, Hilfe bei Computerkrankheiten oder einfach nur durch ein Gespräch. Katrin Witzke half in vielen Stunden beim Layouten der Abbildungen und Literatur. Dies unterstreicht, wie viel Unterstützung ich vom ATB bekam, um das Promotionsziel zu erreichen.

Ein großes Dankeschön gilt auch Kirsten Berger für die englischen Korrekturen. Jane-Maud Osterloh nahm sich trotz ihres knappen Etats die Zeit, als Außenstehende die Arbeit auf Schlüssigkeit und Punkt und Komma zu lesen, wofür ich ihr sehr dankbar bin.

Zu guter Letzt hat auch meine Familie mitpromoviert und für das Zurückstecken danke ich an dieser Stelle ausdrücklich. Auch, dass sie mich immer wieder zu den Realitäten zurückholte und mir den nötigen Abstand, aber auch die Kraft zu meiner Arbeit gab.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur angefertigt habe. Stellen der Arbeit, welche anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entsprechen, wurden als solche kenntlich gemacht.

Weiterhin versichere ich, dass von mir an keiner anderen Stelle ein Promotionsverfahren beantragt wurde.

Güterfelde, den 12. September 2011